

**THERAPEUTISCHER EFFEKT DES
SEROTONIN-ANTAGONISTEN TERGURID
IM MODELL DER MONOCROTALIN-
INDUZIERTEN PULMONALEN
HYPERTONIE DER RATTE**

INAUGURALDISSERTATION

**zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Corinna Kulisch
geb. Kulcke**

Aus dem
Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

und

dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Ralph Theo Schermuly

THERAPEUTISCHER EFFEKT DES SEROTONIN-ANTAGONISTEN TERGURID IM MODELL DER MONOCROTALIN-INDUZIERTEN PULMONALEN HYPERTONIE DER RATTE

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Corinna Kulisch
geb. Kulcke
Tierärztin aus Krefeld

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Joachim Roth
Prof. Dr. Ralph Schermuly

Tag der Disputation: 27. Juni 2011

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Corinna Kulisch

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	12
1.1	Die Entdeckung des Blutkreislaufs und die Anatomie und Funktion des Lungenkreislaufs	12
1.2	Pulmonale Hypertonie	13
1.2.1	Definition	13
1.2.2	Klassifikation und Epidemiologie	16
1.3	Umsetzung im Tiermodell – Monocrotalin-induzierte PH der Ratte.....	18
1.4	Ungleichgewicht von vasodilatativen und	20
	vasokonstriktiven Mediatoren als Ursache der PH	20
1.5	Serotonin (5-HT)	21
1.6	Serotonin in der Pulmonalen Hypertonie.....	26
1.7	Der Serotoninrezeptorantagonist Tergurid.....	27
1.8	Ziel der Arbeit	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Materialien	29
2.1.1	Injektionslösungen und Substanzen	29
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.5	Geräte und Maschinen für Tierpräparation	31
2.1.7	Antikörper	33
2.1.8	Geräte, Software, Makros für Gefäßmorphometrie.....	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Versuchstiere.....	34
2.2.2	Monocrotalin zur Induktion einer pulmonalen Hypertonie	35
2.2.3	Behandlung mit Tergurid	35
2.2.4	Versuchsgruppen	36
2.2.5	Hämodynamische Messungen	39
2.2.5.1	Versuchsvorbereitungen.....	39
2.2.5.2	Narkose.....	39
2.2.5.3	Beatmung	39
2.2.5.4	Präparation der Vene und Arterie.....	40
2.2.5.5	Druckmessungen	41
2.2.5.6	Probenentnahmen	42
2.2.5.7	Berechnungen.....	43
2.2.6	Histologie und Immunhistologie	44

2.2.6.1 Vorbereitungen	44
2.2.6.3 Immunhistologie	45
2.2.6.3.1 Immunhistochemische Doppelfärbung	45
2.2.6.3.2 Immunhistochemische Färbung des 5HT _{2A} -Rezeptors	46
2.2.7 Morphometrische Analyse der Lungengefäße	47
2.2.7.1 Mittlere Wandstärke	47
2.2.7.2 Muskularisierungsgrad	48
2.2.8 Statistische Auswertung	49
3 Ergebnisse	50
3.1 Überlebensrate im Vergleich zwischen mit Tergurid behandelten Tieren und Plazetotieren	50
3.2 Nebenwirkungen der Tergurid-behandelten Ratten	51
3.3. Körpergewicht	52
3.4 Systemisch-arterieller Druck (SAP)	53
3.5 Rechtsventrikulärer Druck (RVSP)	54
3.6 Verhältnis des rechten Ventrikels zum linken Ventrikel plus Septum (RV/SV+S)	55
3.7 Herzzeitvolumen (HZV)	57
3.8.1 Mittlere Wandstärke	58
3.8.1.1 Distale Pulmonalarterien von 25 - 50 µm	59
3.8.1.2 Mittelgroße Pulmonalarterien von 50 - 100 µm	60
3.8.1.3 Große Pulmonalarterien von > 100 µm	62
3.8.2 Muskularisierungsgrad	63
3.9 Expression des 5HT _{2A} Rezeptors in Rattenlungen	66
4 Diskussion	68
4.1 Therapiemöglichkeiten der PAH	68
4.2 Experimentelles Tiermodell der pulmonalen Hypertonie	69
4.3 Tergurid und seine Wirkung in experimentellen Studien der Pulmonalen Hypertonie	71
4.4 Klinische Perspektive	74
5 Zusammenfassung	75
6 Summary	76
7 Literaturverzeichnis	77
8 Publikationen	84

Abbildungsverzeichnis

1. Histologische Merkmale der pulmonalen Hypertension
2. Strukturformel Serotonin (5-HT)
3. Biosynthese und Aufbau von Serotonin
4. Reaktionskette des intrazellulären Botenstoffes IP_3
5. Aktivierung des MAP-Kinase-Weges
6. Strukturformel Tergurid
7. Darstellung der Versuchsgruppen
8. Rechtsherzkatheterisierung: Charakteristische Druckkurve
9. Darstellung der Überlebensrate
10. Darstellung des Gewichtsverlaufs
11. Darstellung des systemisch-arteriellen Druckes
12. Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Druckes
13. Darstellung des Verhältnisses des rechten Ventrikels zum linken Ventrikel plus Septum
14. Darstellung des Cardiac Index
15. Elastica-Kernechtrot-Färbung
16. Darstellung der mittleren Wandstärke in Pulmonalarterien von 25 - 50 μm
17. Darstellung der mittleren Wandstärke in Pulmonalarterien von 50 - 100 μm
18. Darstellung der mittleren Wandstärke in Pulmonalarterien von > 100 μm
19. Immunhistochemische Doppelfärbung
20. Darstellung des prozentualen Anteils nicht, teil oder voll muskularisierter Pulmonalarterien
21. Immunhistochemische Färbung gegen 5-HT_{2A}-Rezeptoren

Tabellenverzeichnis

1. klinische Klassifikation der PAH
2. WHO-Klassifizierung des funktionellen Schweregrades der PAH

Abkürzungen

A.	lat. arteria (Arterie)
APAH	assozierte pulmonalerterielle Hypertonie
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRAC	Ca ²⁺ -released-activated-channels
D	Deutschland
DAG	Diacylglycerin
DN	Dänemark
FPAH	familiäre pulmonalerterielle Hypertonie
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	lat. hora (Stunde)
HCl	Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HZV	Herzzeitvolumen
IHC	Immunhistochemie
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IPAH	idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie
IP ₃	Inositoltriphosphat
K	Kinase

K ⁺	Kalium
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LV	linker Ventrikel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
M	molar
M.	lat. musculus (Muskel)
MAP	Mitogen Activated Protein
MAO	Monoaminoxidase
MCT	Monocrotalin
MCTP	Monocrotalinpyrrol
MetOH	Methanol
MDMA	Methyldioxy-metamphetamin (Ecstasy)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	mittlerer pulmonalarterieller Druck
mol	Mol
MW	Mittelwert
MWST	mittlere Wandstärke
n	number (Anzahl)
1N HCl	1 normale Salzsäure
1N NaOH	1 normale Natronlauge
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natrium
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NO	Stickstoffmonoxid

NYHA	New York Heart Association
°C	Grad Celsius
O ₂	Sauerstoff
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonary arterial pressure (pulmonalarterieller Druck)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCH	pulmonale kapilläre Hämangiomatose
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	platelet derived growth factor
PEEP	positive end-expiratory pressure (positiv-endexpiratorischer Druck)
PH	pulmonale Hypertonie
PI	Phosphatidylinositol
PIP ₂	Phosphatidylinositolbiphosphat
PLC	Phospholipase C
PPHN	persistierende PAH der Neugeborenen
PVOD	Venoocclusive Disease
RV	rechter Ventrikel
RV/LV+S	Ratio aus rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum
RVSP	right ventricular systolic pressure (rechtsventrikulärer systolischer Druck)
S	Septum
s.c.	subkutan
SAP	systemic arterial pressure (systemisch arterieller Druck)
SAS	Schlafapnoe Syndrom
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
SMC	smooth muscle cells
T	Tergurid
USA	United States of America

v.a.	vor allem
vs.	versus (gegen)
VP	ventilation pressure (Beatmungsdruck)
vWF	von Willebrand Faktor (Faktor VIII)
w	week (Woche)
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
5-HT	Serotonin

1 Einleitung

1.1 Die Entdeckung des Blutkreislaufs und die Anatomie und Funktion des Lungenkreislaufs

Die Entdeckung des Blutkreislaufs erfolgte durch William Harvey im 17. Jahrhundert. Nach Studien in Cambridge und Padua erlangte er als Arzt in London großen Ruhm. Sein eigener und auch für die Medizin großer Durchbruch erfolgte nach der Veröffentlichung seines bahnbrechenden Werks „Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis“ (Anatomische Studien über die Bewegung des Herzens und des Blutes). In diesem widerlegte er die bis dahin gültige Anschauung, dass das von der Leber gebildete Blut im Gewebe versickert und dort verbraucht wird. Er postulierte, dass das Blut auf einer geschlossenen Bahn durch den Körper bewegt wird und dass der Schlag des Herzens hierfür die einzige Ursache sei. Er schrieb: „Es sei gestattet, dies einen Kreislauf zu nennen“ (Schmidt, Thews 1997).

Der Lungenkreislauf oder auch kleine Körperkreislauf, beginnt mit der Pulmonalarterie, die aus der rechten Herzkammer entspringt und sich rasch in die rechte und linke Pulmonalarterie gabelt. Ihre Äste folgen der Verzweigung des Bronchialbaums und teilen sich entsprechend der Bronchien und Bronchiolen in kleinere Arterien bis hin zu Arteriolen auf. Sie führen das mit CO₂ angereicherte, sauerstoffarme Blut dem Kapillarnetz der Lungenalveolen zu.

Deren enorme Anzahl sichert eine große Fläche für den Austausch von Kohlendioxid gegen Sauerstoff. Das O₂-reiche Blut wird dann zurück über die Venolen zu den Lungenvenen und von diesen zum linken Vorhof geführt (Nickel, Schummer, Seiferle 1996).

Die Alveolen sind ausgekleidet mit einer einfachen Schicht von Epithelzellen, denen gleich die dünne Wand der Pulmonalkapillaren folgt. Das ist wichtig, damit die Diffusionsbarriere leicht zu überwinden ist, da in den Kapillaren unter physiologischen Bedingungen ein niedriger transmuraler Druck herrscht. Dies ist einer der Unterschiede des Lungenkreislaufs zur Durchblutung anderer Organe. Während der mittlere Blutdruck in den meisten Gefäßen zwischen 60 und 100 mm Hg liegt, übersteigt er in Lungengefäßen physiologisch normalerweise nicht den

Wert von 20 mm Hg. Es herrscht also ein Niederdruck- und Hochflusssystem, wodurch erstens verhindert wird, dass Flüssigkeit aus den Pulmonalgefäßen in das Interstitium übertritt und zweitens wird erreicht, dass das Herz durch den geringen Gegendruck nur wenig Energie verbrauchen muss. Die dünnen Gefäßwände sind ebenfalls eine Besonderheit des kleinen Körperkreislaufs. Normalerweise haben Arteriolen eine dicke Schicht glatter Muskelzellen, hier aber gehen die muskularisierten Arterien in kleine, dünne nur noch teilweise oder gar nicht muskularisierte Gefäße über. Ein weiterer Unterschied ist die Regulierung des Tonus der Gefäße. Während im systemischen Kreislauf auf Hypoxie eine Vasodilatation erfolgt, kommt es im pulmonalen Kreislauf zu einer Vasokonstriktion (Euler-Liljestrand-Mechanismus). Durch diese hypoxiebedingte Widerstandserhöhung besteht die Möglichkeit, den Blutstrom aus Lungenbezirken schlechter Ventilation in gut ventilierte Bereiche umzuleiten. Da aber nicht jede Hypoxie nur eine Folge verminderter Ventilation ist, reicht dieser Mechanismus gerade unter pathologischen Bedingungen oft nicht aus, um das Sauerstoffdefizit auszugleichen. Daher ergibt sich hier ein wichtiger therapeutischer Ansatzpunkt (Schmidt, Thews 1997).

1.2 Pulmonale Hypertonie

1.2.1 Definition

Pulmonale Hypertonie ist ein Syndrom, das eine Vielzahl degenerativer und inflammatorischer Lungenerkrankungen als Grundlage haben kann. Als Auslöser gelten zum Beispiel Hypoxie, Entzündungen, Thromboembolie und Hyperzirkulation, teilweise ist die Ursache aber auch unbekannt. Die pulmonale Hypertonie (PH) hat eine schlechte Prognose und betrifft eine große und immer weiter wachsende Patientengruppe.

Bis 2008 wurde entsprechend der WHO die PH definiert als ein dauerhafter Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (PAP) in Ruhe über 25 mm Hg und unter Belastung über 30 mm Hg (Rubin, 1997). Auf dem 4. Welt-Symposium für pulmonale Hypertonie im Februar 2008 wurde die Definition der Erkrankung unter Belastung ganz gestrichen und man spricht heute bei einem PAP von 21 – 25 mm Hg in Ruhe von einer latenten PH und ab einem PAP von 25 mm Hg von einer manifesten

pulmonalen Hypertonie. Da diese Definition eine invasive Pulmonalisdruckmessung voraussetzt, kann man sich zur Identifizierung folgenden Richtwert hinzuziehen, der auf echokardiographischen Kriterien beruht. Danach wird ab einem systolischen pulmonalarteriellen Druck von mehr als 36 mm Hg von einer pulmonalen Hypertonie gesprochen (4th World Symposium on PH, Dana Point, CA, 2008).

Neben dem chronisch erhöhten Gefäßdruck kommt es zu einer Reihe weiterer Veränderungen. In Folge der Hypoxie im Blut verschiebt sich das komplexe Gleichgewicht vasokonstriktiver und vasodilatativer Mediatoren in Richtung der Vasokonstriktoren. Dadurch herrscht ein erhöhter Vasotonus.

Ebenso kommt es zu strukturellen Veränderungen, dem so genannten „Vascular Remodeling“. Hervorzuheben ist hier die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Physiologisch besitzen Gefäße in der Lunge bis zu einer Weite von ca. 80 µm Lumen eine kontinuierliche Media. Die kleineren Gefäße sind nur partiell muskularisiert und besitzen Zellen mit Eigenschaften zwischen glatten Muskelzellen und Perizyten, so genannte intermediäre Zellen. Charakteristisch für das Remodeling sind eine Hypertrophie der Media und eine distale Aussprossung der glatten Muskelzellen der Media. Im Zuge der „de Novo Muskularisierung“ weisen selbst distale Gefäße mit einem Lumen von nur 15 µm eine komplette Muskularis auf. Die neuen Muskelzellen differenzieren sich wahrscheinlich aus intermediären Zellen und Perizyten, eine Beteiligung der Fibroblasten des umliegenden Interstitiums wird ebenfalls diskutiert. Eine weitere wichtige Rolle spielen bestimmte Faktoren, wie Kaliumkanäle, Kalziumkanäle, Bone Morphogenetic Protein (BMP), diverse Wachstumsfaktoren, Serotonin (5-HT) und andere (Meyrick 1978, Jones 1999).

Eine verstärkte Thrombogenität bzw. eine verminderte fibrinolytische Aktivität des pulmonalen Gefäßbettes führen im Laufe der Erkrankung zu einer Verringerung des Lumens der kleinen Lungengefäße und einer progredienten Abnahme des Gesamtquerschnitts der Lungenstrombahn (Hoeper 2003).

Durch die morphologischen Veränderungen dieser verschiedenen Mechanismen kommt es zu einer Widerstandserhöhung im kleinen Kreislauf, wodurch die Nachlast des rechten Ventrikels ansteigt. Dieser reagiert mit einer Hypertrophie seiner Muskulatur, es entsteht ein „Cor Pulmonale“ und die pulmonale Hypertrophie manifestiert sich.

Am Anfang sind die Patienten asymptomatisch oder zeigen nur unter extremer Belastung körperliche Schwächen, da das Herzminutenvolumen nicht mehr adäquat ansteigen kann. Im fortgeschrittenen Stadium nimmt es auch in Ruhe ab. Es entwickelt sich eine Trikuspidalklappeninsuffizienz, da die dünnen Klappen dem hohen Druck während der Kontraktion nicht mehr Stand halten können. Es kommt zu einem Rückfluss und zu Stauungen im großen Kreislauf und ohne wirksame Therapie führen diese Mechanismen innerhalb weniger Jahre zum Tod durch Rechtsherzversagen.

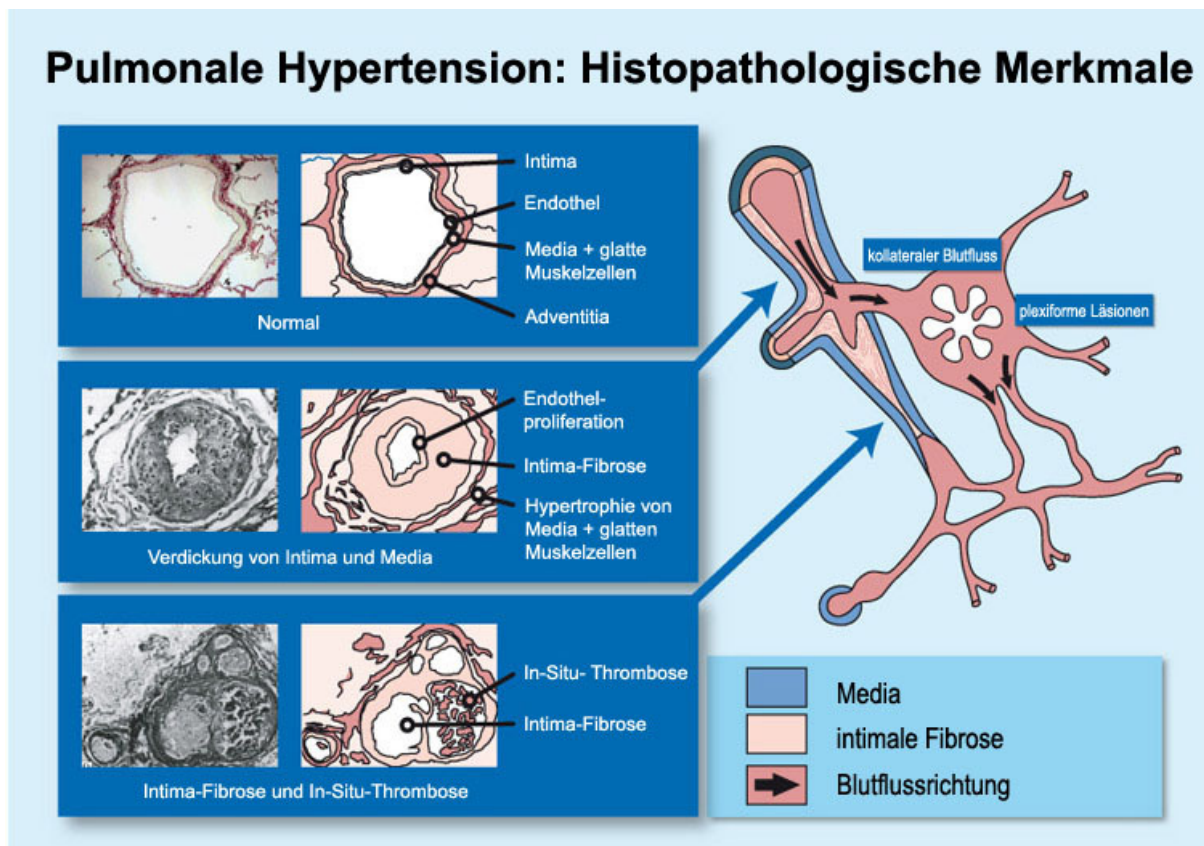


Abbildung 1: Histologische Merkmale der pulmonalen Hypertonie

Charakteristische Veränderungen sind die Verdickung von Intima und Media durch Endothelproliferation, Intima-Fibrose und Hypertrophie von Media und glatten Muskelzellen und die Ausbildung von In-Situ-Thrombosen (modifiziert nach www.pah-info.com).

1.2.2 Klassifikation und Epidemiologie

Die erste Einteilung wurde auf einem Symposium der World Health Organization (WHO) schon im Jahre 1973 festgelegt. Man sprach ganz einfach von einer primären pulmonalen Hypertonie, wenn die Ursache unbekannt war und von einer sekundären PH, die in Folge einer Erkrankung oder bestimmter Risikofaktoren entstand (Hatano 1975, Humbert 2001).

Die erste Fassung der heute gültigen Einteilung wurde 1998 auf einer WHO-gesponserten Expertentagung in Evian, Frankreich festgelegt. Auf einem erneuten Symposium 2003 in Venedig, Italien wurde sie noch einmal leicht modifiziert. Die Einteilung in 5 Gruppen richtet sich nach äthiologischen, pathogenetischen und therapeutischen Aspekten.

1. PULMONALARTERIELLE HYPERTONIE

1.1 Idiopathische PAH (IPAH)

1.2 Familiäre PAH (FPAH)

1.3 Assoziierte PAH (APAH) – mit:

1.3.1 Kollagenose / Vaskulitis

1.3.2 Angeborenen arteriovenösen Shunts

1.3.3 Portaler Hypertension

1.3.4 HIV-Infektion

1.3.5 Medikamenten/Toxinen (z.B. Appetitzügler)

1.3.6 Anderen Krankheiten (z.B. Speicherkrankheiten, Splenektomien, Schilddrüsenerkrankungen)

1.4 PAH bei venösen oder kapillären Lungenkrankheiten

1.4.1 Venocclusive Disease (PVOD)

1.4.2 Pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)

1.5 Persistierende PAH der Neugeborenen (PPHN)

2. PULMONALE HYPERTONIE BEI LINKSHERZERKRANKUNG

2.1 Atriale oder ventrikuläre Herzerkrankungen

2.2 Erkrankungen der Mitral- oder Aortenklappen

3. PULMONALE HYPERTONIE BEI LUNGENERKRANKUNGEN UND/ODER HYPOXIE
<p>3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)</p> <p>3.2 Interstitielle Lungenerkrankungen</p> <p>3.3 Schlafbezogene Atmungsstörungen / Schlafapnoe Syndrom (SAS)</p> <p>3.4 Alveoläre Hypoventilation</p> <p>3.5 Chronische Höhenkrankheit</p> <p>3.6 Anlage- bzw. entwicklungsbedingte Fehlbildungen</p>
4. PULMONALE HYPERTONIE BEI CHRONISCHER THROMBOSE UND/ODER EMBOLIE
<p>4.1 Thromboembolie der proximalen Pulmonalarterien</p> <p>4.2 Thromboembolie der distalen Pulmonalarterien</p> <p>4.3 Nicht-thrombotische Lungenembolien (z.B. Tumor, Parasiten, Fremdkörper)</p>
5. PULMONALE HYPERTONIE AUFGRUND VERSCHIEDENER URSACHEN
<p>5.1 Sarkoidose</p> <p>5.2 Histiozytose X</p> <p>5.3 Lymphangiomatose</p> <p>5.4 Kompression der Pulmonalgefäße (z.B. Adenopathie, Tumor, fibrosierende Mediastinitis)</p>

Tabelle 1: klinische Klassifikation der PAH
(Weltkonferenz Venedig, 2003)
(modifiziert nach Simonneau 2004)

Die Häufigkeit der einzelnen Erkrankungsformen ist nicht genau bekannt, man weiß jedoch, dass die idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie eine seltene Erkrankung ist. In Deutschland leiden momentan ca. 100 – 200 Patienten an ihr, auch in den USA sind es weniger als eintausend. Den weiteren Gruppen sind jedoch wesentlich mehr Patienten zuzuordnen, allein 4000 Patienten leiden in Deutschland

an einer PH in Folge eines angeborenen Herzfehlers. Auch die Assoziation zwischen Bindegewebserkrankungen und dem Auftreten einer PH hat eine besondere Bedeutung. Es zeigt sich also, dass das Syndrom pulmonale Hypertonie in seiner Gesamtheit eine große Patientengruppe betrifft (Hoeper 2003).

WHO-Klassifikation	Klinik	Überlebensdauer ohne Behandlung
Klasse I asymptomatisch	minimale Symptome, keine Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit, Beschwerdefreiheit bei normaler Anstrengung	5 Jahre
Klasse II leicht	Dyspnoe oder Erschöpfungszustände und Beinahe-Synkopen bei normaler Aktivität, beschwerdefrei im Ruhezustand, leichte Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit	5 Jahre
Klasse III mittelschwer	Dyspnoe, Erschöpfung, Thoraxschmerz oder Synkope bei minimaler Belastung, körperliche Leistungsfähigkeit eingeschränkt , beschwerdefrei im Ruhezustand	2,6 Jahre
Klasse IV schwer	Dyspnoe oder Erschöpfung im Ruhezustand, jegliche Aktivität wird als unangenehm empfunden , Anzeichen einer manifesten Rechtsherzinsuffizienz	0,5 Jahre

Tabelle 2: WHO-Klassifizierung des funktionellen Schweregrades der PAH

1.3 Umsetzung im Tiermodell – Monocrotalin-induzierte PH der Ratte

Das hier verwendete Tiermodell bedient sich des Pyrrolizidinalkaloides Monocrotalin (MCT) der Pflanze *Crotalaria spectabilis*. Lalich und Merkow beschrieben erstmals 1961 bei Ratten eine Entzündung in den Pulmonalarterien nach Fütterung mit Samen von *Crotalaria spectabilis*. Später wurden diese Effekte auch bei anderen Säugetieren untersucht.

Crotalaria spectabilis gehört zu der Familie der Leguminosae und wächst hauptsächlich in den USA und Asien. Pyrrolizidinalkaloide sind immer wieder verantwortlich für Vergiftungen, beim Menschen z.B. durch die Aufnahme kontaminierten Tees oder Getreides, bei Tieren durch kontaminiertes Futter oder befallene Weiden (Nobre et al. 2005).

Wird Monocrotalin einmalig subkutan gespritzt, entwickeln die Tiere 3-4 Wochen später eine pulmonale Hypertonie mit vaskulärem Remodeling (Schermlay et al. 2005), die hauptsächlich der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie des Menschen entspricht. Das Monocrotalinmodell ist das relevanteste Modell der pulmonalen Hypertonie.

Monocrotalin erlangt seine Toxizität erst nach Metabolisierung in der Leber durch Oxidasen (Cytochrom-P540) zu Monocrotalinpyrrol oder Dehydromonocrotalin. Monocrotalinpyrrol (MCTP) gilt als biologisch aktiver Hauptmetabolit (Pan et al. 1991, Kashara et al. 1997).

Angriffspunkt für die akut toxische Wirkung ist das Endothel der Pulmonalarterien (Wilson et al. 2000, Hoorn et al. 1993). Die Metaboliten werden an das Blut abgegeben und gelangen direkt in die Lunge. Das instabile Monocrotalinpyrrol bindet sich an die Erythrozyten und verlängert so seine Halbwertszeit. Ungebunden zerfällt es im Serum (in vitro) innerhalb von 5 Sekunden (Bruner et al. 1986). Nach bereits 24 Stunden lassen sich die Metaboliten weder im Gewebe noch in Körperflüssigkeiten nachweisen, da sie komplett über die Niere ausgeschieden wurden (Hayashi et al. 1967).

Vier bis fünf Tage nach Applikation von Monocrotalin lässt sich eine signifikante Zellschwellung der Endothelzellen in vivo nachweisen. Es wird eine frühe exsudative und eine folgende proliferative Phase unterschieden, wobei initial ein Ödem um die perialveolären Kapillaren mit einem erhöhten Gehalt an hochmolekularen Proteinen entsteht (Sugita et al. 1983). Die aktiven Pyrrole haben eine antimittotische Wirkung, welche zu der typischen Megalozytose der Typ II Pneumozyten führt (Wilson & Segal, 1990). Eine Megalozytose zeigt sich auch in Makrophagen der Alveolen (Sugita et al. 1983). Zu Veränderungen mit Ödemen der Adventitia und Akkumulation von Entzündungszellen kommt es auch in den größeren, peribronchialen Gefäßen. Gleichzeitig bildet sich schon nach wenigen Tagen eine glattmuskuläre Zellschicht in physiologisch nicht muskularisierten Arteriolen aus (Wilson et al. 1989). Der initiale toxische Effekt wird als Stimulus für verschiedene biologische Pathomechanismen gesehen, welche zu einem progressiven Verlauf der Veränderungen führen. Es wird eine zunehmende Hypertrophie der Lamina Media vor allem der präkapillären Arteriolen beobachtet. Glatte Muskelzellen hypertrophieren und hyperplasieren und es kommt zu einer Zunahme an extrazellulären Matrixproteinen. Ebenso sammeln sich Mastzellen in den

mediastinalen Lymphknoten und in der Umgebung von Bronchien und Pulmonalarterien an (Miyata 2000, Valdivia 1967). Nach der exsudativen Phase sind an Veränderungen in der Adventitia noch eine Zunahme an Kollagen, Infiltration von Leukozyten und Fibrinablagerungen zu beobachten (Reindel et al. 1990).

Interessant ist, dass ein hepatotoxischer Effekt erst nach Applikation einer hohen Dosis von MCT auftritt. Es kommt dann zu einer periazinären Nekrose von Hepatozyten, Zellhyperplasien, Leberzirrhose und –fibrose und in Folge dessen zu einem toxischen Leberversagen. Weitere Schäden verursacht MCT in der Niere, hier entstehen Glomerulopathien und durch den Anstieg von Ammoniak durch den Leberschaden kommt es zu zentralnervösen Symptomen (Environmental Health Criteria 80 : Pyrrolizinine Alkaloids, WHO 1988).

1.4 Ungleichgewicht von vasodilatativen und vasokonstriktiven Mediatoren als Ursache der PH

Trotz der Verschiedenheit der Formen der pulmonalen Hypertonie kann man drei Hauptfaktoren für den erhöhten Widerstand in der Pulmonalisstrombahn zusammenfassen:

- eine verstärkte Neigung zur Vasokonstriktion infolge eines Ungleichgewichts zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Faktoren
- eine verstärkte Thrombogenität bzw. eine verminderte fibrinolytische Aktivität des pulmonalen Gefäßbettes
- eine verstärkte Zellproliferation in der Pulmonalisstrombahn (Remodeling)

Es liegt also eine Störung der physiologischen Balance zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren, zwischen Wachstumsinhibitoren und mitogenen Faktoren, sowie zwischen antithrombotischen und prothrombotischen Determinanten vor.

Verschiedene wichtige Signalwege sind im Krankheitsbild der PAH aus dem Gleichgewicht geraten.

Die verstärkte pulmonalarterielle bzw. –arterioläre Konstriktionsneigung entsteht durch eine Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasodilatation, obgleich die

Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), welcher hier der wichtigste Vasodilatator ist, offenbar nicht in allen Fällen vermindert ist. Jedoch kommt es zu einer vermehrten Bildung von Phosphodiesterase 5 (PDE 5), welche den NO-induzierenden Second Messenger cGMP hydrolisiert (Wharton et al. 2005).

Oft ist die Produktion von vasodilatierendem Prostazyklin erheblich reduziert, während das vasokonstriktorisch wirkende Thromboxan A verstärkt produziert wird (Christman et al. 1992). Daneben kommt es auch zur vermehrten Bildung anderer vasokonstriktorischer Substanzen, darunter sind v.a. Endothelin (Giaid et al. 1993) und Serotonin (Farber 2004) zu nennen, deren vermehrtes Auftreten mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (Rubens et al. 2001).

Diese Veränderungen gelten sowohl für Patienten mit IPAH, als auch für Monocrotalin-behandelte Ratten, bei beiden konnte ein erhöhter Serotoninspiegel im Plasma festgestellt werden.

1.5 Serotonin (5-HT)

1930 isolierte Vittorio Erspamer aus der Magenschleimhaut von Kaninchen einen Stoff, der die glatte Muskulatur kontrahierte. Er nannte ihn Enteramin (Erspamer, Asero 1952). Dr. Irving Page beschrieb erstmalig 1948 in seinem Labor in der Cleveland-Klinik das Vorkommen und die Wirkung von Serotonin (Rapport, Green, Page 1948) und 1952 stellte man fest, dass beide Stoffe identisch waren (Erspamer, Asero 1952). Eine weitere wichtige Entdeckung gelang 1953 Betty Twarog im selben Labor mit dem Nachweis von Serotonin im Gehirn (Twarog, Page 1953).

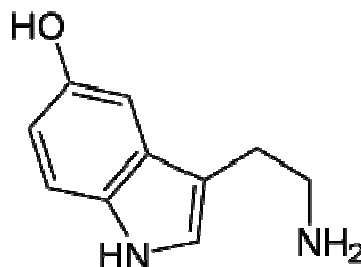


Abbildung 2: Strukturformel Serotonin (5-HT)
Chemisch gesehen handelt es sich um ein Alkaloid mit Tryptamin-Struktur.

Serotonin, heute auch 5-Hydroxytryptamin (5-HT) oder Enteramin genannt, gehört mit Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin zu der Gruppe der Monoamine (Schmidt, Thews 1997). Es fungiert als Gewebshormon, bzw. Neurotransmitter im Zentralen Nervensystem, Darm, Herz-Kreislaufsystem und im Blut.

Der Name leitet sich von seiner Wirkung auf den Blutdruck ab: „Serotonin“ ist der Teil des „Serums“, der den „Tonus“ in den Blutgefäßen reguliert.

5-HT wird aus der Aminosäure L-Tryptophan unter Mitwirkung von Vitamin B im ZNS, in der Lunge und der Milz und in den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut gebildet.

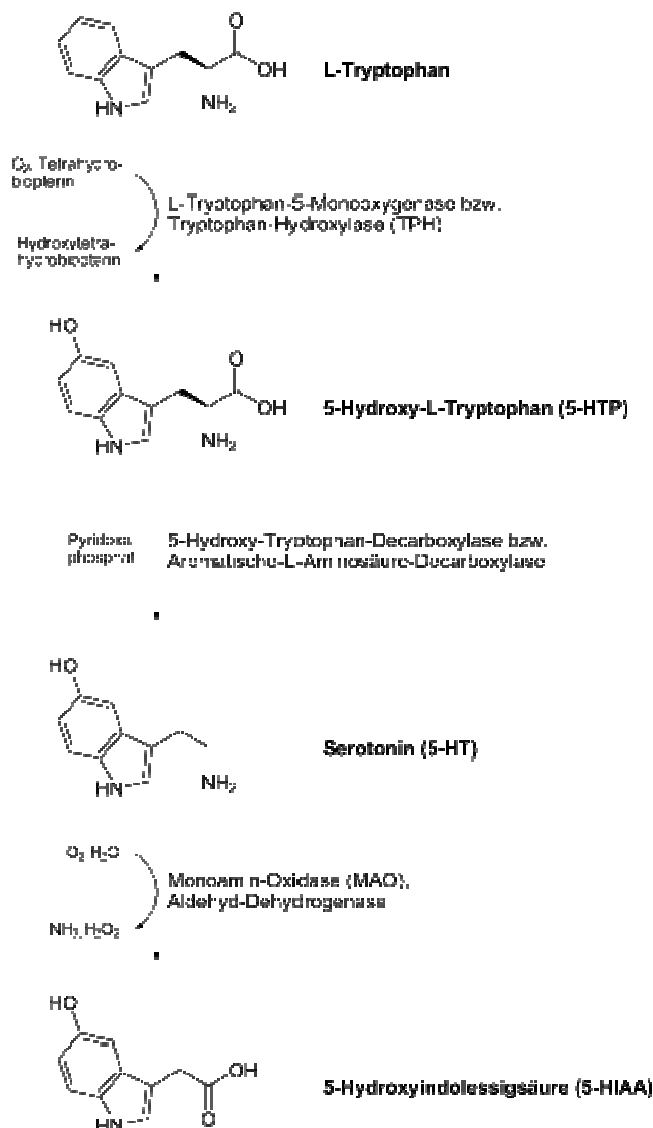


Abbildung 3: Biosynthese und Abbau von Serotonin
(L. Temgoua, 2007)

Das Enzym Monoaminoxidase (MAO Typ A) baut freies Serotonin zu 5-Hydroxy-indolylacetaldehyd ab. Ebenso kann 5-HT aktiv über Transporter in die Neuronen rückresorbiert und wiederverwertet werden.

Neuronal wird 5-HT in Vesikeln in der Präsynapse gespeichert, nicht neuronal hauptsächlich in den enterochromaffinen Zellen (90%) und in den Thrombozyten und Mastzellen (10%).

Serotonin besitzt sowohl vasokonstriktorisches, als auch vasodilatatorische Eigenschaften, der vasomotorische Effekt ist abhängig von der Lokalisation der 5-HT- Rezeptoren am Endothel und an den glatten Muskelzellen.

Vasodilatation wird unter Einfluss von 5-HT an einer Reihe von Arterien mit intaktem Endothel beobachtet, z.B. in der Skelettmuskulatur. Nach Aktivierung parasympathisch-cholinergischer Neurone erfolgt im Gastrointestinaltrakt eine Freisetzung von Serotonin aus enterochromaffinen Zellen und es kommt zu einer arteriolen Dilatation, zusätzlich aber auch zu einer Vasokonstriktion der Venolen und zu einer Erhöhung der Kapillarpermeabilität. Dadurch wird den Verdauungsdrüsen mehr Flüssigkeit zur Verfügung gestellt.

Ebenso vasokonstriktorisch wirkt Serotonin an Arterien mit geschädigtem Endothel. Es wird aus den aggregierenden Thrombozyten freigesetzt und führt zusammen mit anderen vasokonstriktorisch wirkenden Stoffen, wie Thromboxan A₂ und ATP zum Verschluss des Gefäßes und somit zur Blutstillung.

Stark vasokonstriktorisch wirkt 5-HT auch in den Piaarterien des Gehirns, daher wird eine Beteiligung an der Ausbildung von Gefäßspasmen bei Migräne und bei Subarachnoidalblutungen vermutet (Schmidt, Thews 1997).

Die Kaskade der Signaltransduktion ist abhängig vom Serotoninrezeptortyp. Derzeit kennt man mindestens 15 Rezeptoren. Sie werden in 7 Familien zusammengefasst: 5-HT₁ bis 5-HT₇ (Hoyer et al. 1994).

Die 5-HT₃-Rezeptoren bestehen aus Na⁺/K⁺-Kanälen, alle übrigen bekannten 5-HT-Rezeptoren sind an heterotrimere G-Proteine gekoppelt. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind heptahelikale Transmembranproteine. Sie bestehen aus Untereinheiten mit sieben (griechisch „hepta“) die Zellmembran durchspannenden (transmembranären) Helixstrukturen. Das heterotrimere GTP-bindende Protein (kurz G-Protein) bindet an der intrazellulären Seite an den Rezeptor. In Abhängigkeit

der jeweiligen G-Proteinfamilie, werden durch die Aktivierung der Untereinheiten unterschiedliche Botenstoffe gebildet.

Der 5-HT₁-Rezeptor ist an das hemmende G_i-Protein gebunden und führt zu einer Hemmung der Adenylatzyklase.

Die Unterformen der 5-HT₂-Rezeptorfamilie sind mit G_q-Proteinen verpaart, welche zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und damit zur Bildung der Second Messenger IP₃ und DAG und zur Freisetzung von Ca²⁺ führen.

Die Zugehörigkeit der übrigen Rezeptoren ist teilweise noch nicht ganz geklärt, die meisten sind jedoch an das G_s-Protein gekoppelt, welches zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase führt (Richter et al. 2003).

Eine Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch Bindungen eines Liganden, z.B. Serotonin, führt zu einer Aktivierung des aus drei Untereinheiten (α , β und γ) bestehenden (heterotrimeren) G-Proteins. An der α -Untereinheit des G-Proteins ist im inaktiven Zustand GDP gebunden, die Aktivierung des Rezeptors sorgt für den Austausch von GDP gegen GTP. Der G-Protein-Komplex wird durch die Bindung des GTP instabil. Als Folge ändert sich die Konformation des heterotrimeren G-Proteins und es kann in die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheit zerfallen. Die aktivierten G-Proteine können nun die exogenen, durch den Liganden übertragenen Signale in das Zellinnere weiterleiten (Signaltransduktion).

Am 5-HT_{2A}-Rezeptor aktiviert die α -Untereinheit des G_q-Proteins die Phospholipase C. Ein gewöhnliches Lipid der Zellmembran, Phosphatidylinositol (PI), erhält zeitgleich zwei zusätzliche Phosphatgruppen und wird zu Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP₂). Die PLC spaltet nun PIP₂ in Inositoltriphosphat (IP₃) und das Lipid Diacylglycerin (DAG). DAG verbleibt in der Membran, IP₃ diffundiert ins Plasma und aktiviert IP₃-Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum. Es erfolgt eine Freisetzung von Ca²⁺ in das Cytoplasma, welches eine Rolle als weiterer Botenstoff spielt. Einerseits führt eine Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels zur Aktivierung Ca²⁺-sensibler Kanäle (Ca²⁺-release-activated channels, CRAC) (Himanshu et al. 1997) und damit zu einem weiteren Anstieg des Ca²⁺-Spiegels durch Einstürmen extrazellulärer Ca²⁺-Ionen. Andererseits aktiviert Ca²⁺ eine Proteinkinase, die wiederum Funktionsproteine phosphoryliert und damit aktiviert. In glatten Muskelzellen kommt es durch den hohen Ca²⁺-Spiegel zu einer Kontraktion der Zelle. Ca²⁺ reagiert mit Calmodulin (CaM) zum Ca²⁺/CaM-Komplex, der die Myosinkinase (Myosin-light-

chain-kinase) aktiviert. Diese überträgt eine Phosphatgruppe von ATP auf die leichte Kette des Myosins, sodass es zu einer Interaktion mit Aktin und somit zu einer Kontraktion kommt.

Das in der Membran verbliebene Spaltprodukt DAG fungiert ebenfalls als Botenstoff. Es aktiviert eine membranständige Proteinkinase, die die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Funktionsproteinen bewirkt.

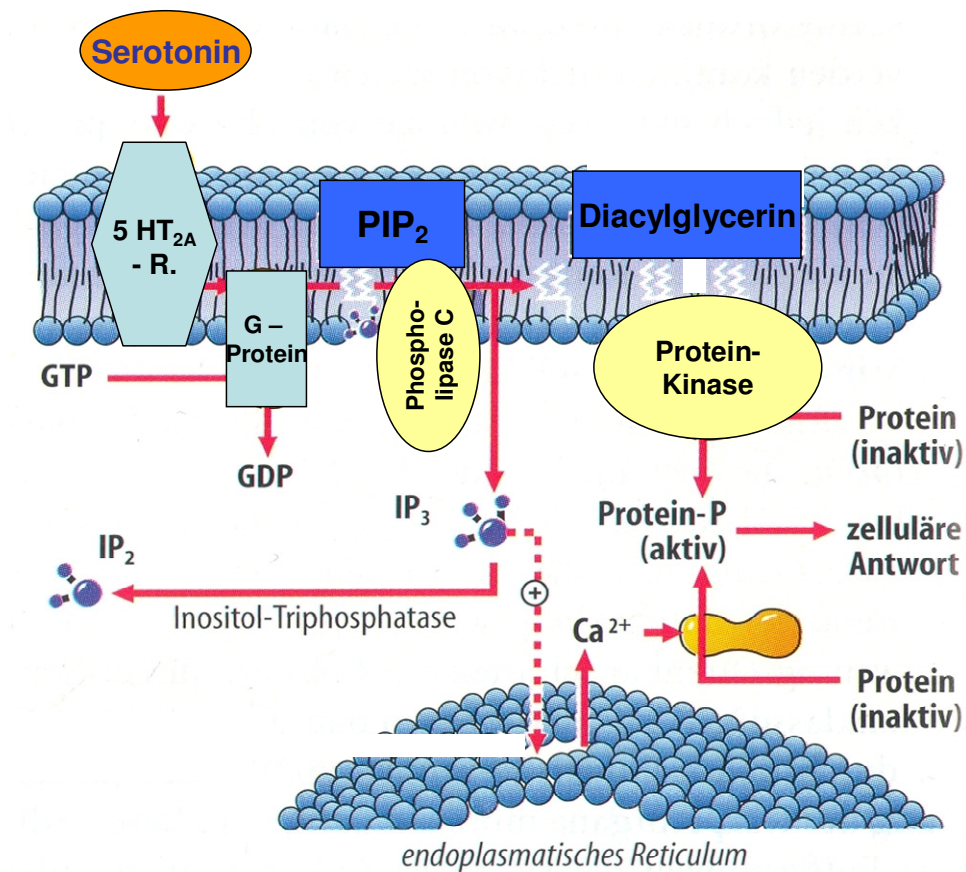


Abbildung 4: Reaktionskette des intrazellulären Botenstoffes IP₃

Das extrazelluläre Signal wird über ein G-Protein vermittelt, das die PLC aktiviert. PIP₂ der Plasmamembran wird in IP₃ und Diacylglycerin gespalten. IP₃ setzt Ca²⁺ frei, welches eine Proteinkinase aktiviert und dadurch zu weiteren Signaltransduktionen führt (modifiziert nach Schmidt, Thews 1997).

Der mitogene Einfluss von Serotonin, der zu einer Proliferation der glatten Muskelzellen (SMCs) führt, konnte noch nicht genau geklärt werden. Es wird vermutet, dass nach Bindung von Serotonin an membranständige Rezeptoren, aber

auch nach Einschleusung durch 5-HT-Transporter der MAP-Kinase-Weg (mitogen-activated-protein) aktiviert wird. Dieser Signalweg umfasst mindestens drei "in Serie" geschaltete Kinasen (MAP-KK-Kinase, MAP-K-Kinase und MAP-Kinase), die in dieser Reihenfolge durch Phosphorylierung aktiviert werden. Wenn die MAP-Kinasen aktiviert sind, akkumulieren sie im Zellkern, wo sie nun kerneigene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und dadurch die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen regulieren.

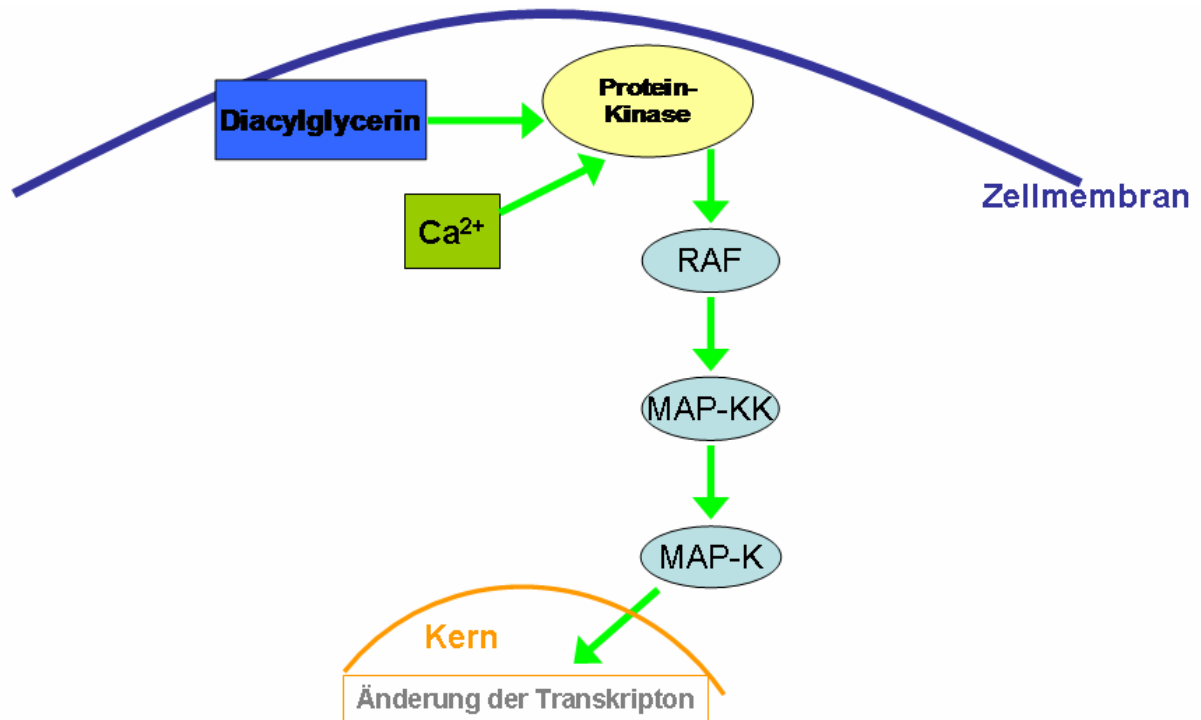


Abbildung 5: Aktivierung des MAP-Kinase-Weges

Durch den erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel und durch Diacylglycerin wird die Proteinkinase C aktiviert. Diese aktiviert durch Phosphorylierung MAP-Kinasen, die eine Änderung der Genexpression und die Auslösung von Proliferation bewirken.

1.6 Serotonin in der Pulmonalen Hypertonie

Die Serotoninsignaltransduktionswege spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung der PAH, dafür sprechen auch einige relevante Forschungsergebnisse:

- Um 1960 während einer Magersuchtepidemie konnte ein erster Zusammenhang zwischen dem Appetitzügler Aminorex und dem Risiko an PAH zu erkranken festgestellt werden (Kay et al. 1971).
- Das gleiche Phänomen zeigte sich in den 80er Jahren. Bei Personen, die den Schlankmacher Fenfluramin zu sich nahmen, trat 30-mal häufiger eine PAH auf, als beim Rest der Bevölkerung (Abenhaim et al, 1996).
- Bei Knock-out Mäusen, bei denen das Gen für den 5-HT-Transporter oder für den 5-HT₂-Rezeptor ausgeschaltet ist, entwickeln sich unter Einfluss chronischer Hypoxie keine Anzeichen eines pulmonalen Hochdrucks oder des „Vascular Remodeling“ (Eddahibi et al. 2000).
- Die „Fawn-hooded“-Ratte, die einen Defekt im 5-HT-Speicherpool in den Thrombozyten hat, entwickelt schon unter geringem hypoxischen Einfluss Anzeichen einer ausgeprägten pulmonalen Hypertension. Dies wird auf die erhöhte Serotoninplasmakonzentration zurückgeführt (Ashmore et al. 1991).
- Die Einnahme Serotonin-ähnlicher Drogen, wie Ergotamin, Methysergid oder MDMA (Ecstasy), fördert die Entwicklung fibrosierender Herzklappenerkrankungen (Setola et al. 2003).

1.7 Der Serotoninrezeptorantagonist Tergurid

Tergurid (Teluron ®) ist ein Serotoninrezeptorantagonist, der in Japan seit 1995 zur Behandlung von Hyperprolaktinämie und von Hypophysenadenomen zugelassen ist.

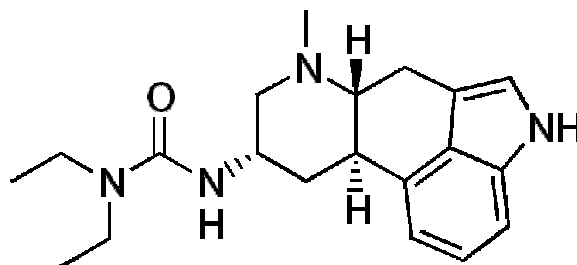


Abbildung 6: Strukturformel Tergurid

Tergurid fungiert als partieller Dopamin D₂-Rezeptor Agonist und als Antagonist des 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptors.

Tergurid wurde von der Firma Schering AG (Berlin, Deutschland) entwickelt und wird von der Firma Ergo-Nex Pharma (Appenzell, Schweiz) vermarktet.

Es agiert als partieller Dopamin-D₂-Rezeptoragonist in der Hypophyse. Zudem blockiert Tergurid gezielt den 5-HT_{2A}- und den 5-HT_{2B}-Rezeptor und verhindert dadurch die Bindung von Serotonin und somit die Aktivierung der Signaltransduktion.

Die übliche klinische Dosis beträgt 0,5 mg/Mensch, zweimal täglich verabreicht. Nach oraler Aufnahme dieser Dosis erreicht die Plasmakonzentration von Tergurid ihr Maximum nach ca. einer Stunde und wird dann langsam mit einer Halbwertszeit von 3 Stunden wieder abgebaut. 24 Stunden nach der Einnahme ist Tergurid im Blut praktisch nicht mehr nachweisbar.

Unter der Therapie mit Tergurid treten nur wenige Nebenwirkungen auf.

Statistiken besagen, dass ca. 9,42 % der Patienten an Übelkeit und 2,46 % an Erbrechen leiden. Bei 1,23 % tritt Schwindel, bei 1,15 % tritt vermehrte Müdigkeit auf und bei ca. 0,96 % der Patienten kommt es zu Kopfschmerzen.

1.8 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die therapeutische Wirkung des Serotonin-Rezeptorantagonisten Tergurid auf die verschiedenen pathophysiologischen und pathohistologischen Aspekte der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte untersucht werden.

Tergurid ist ein in Japan und der Schweiz zur Behandlung von Migräne und Hyperprolaktinämie zugelassenes Medikament, das selektiv die Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A} und 5-HT_{2B} blockiert und somit die Wirkung von Serotonin hemmt.

Neben der Untersuchung des therapeutischen Einflusses von Tergurid auf den Krankheitsverlauf der PAH sollte die Expression des 5HT_{2A}-Rezeptors immunhistologisch in Lungen Monocrotalin-behandelter Ratten und gesunder Kontrolltiere dargestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Injektionslösungen und Substanzen

Injektionslösung	Handelsname	Firma, Sitz
Atropinsulfat (0,5 mg/ml)		Braun Melsungen, D
Heparin	Liquemin N 25000 [®]	Roche Basel, CH
Hydroxyethylstärke	HAES [®]	Fresenius Kabi Bad Homburg, D
Ketaminhydrochlorid (100 mg/ml)	Ketamin [®]	Pharmacia Erlangen, D
Lidocainhydrochlorid 2%	Xylocain [®]	Astra Zeneca Wedel, D
Medetomidinhydrochlorid (1 mg/ml)	Domitor [®]	Pfizer Karlsruhe, D
Monocrotalin	Crotaline [®]	Sigma Aldrich Steinheim, D
Substanzen		
Beatmungsgas	50% O ₂ , 50% N ₂	Air Liquid Siegen, D
Enrofloxacin	Baytril 2,5% [®]	Bayer Vital GmbH Leverkusen, D
Isofluran	Forene [®]	Baxter München, D
Natronlauge 1N (1mol/l)		Merck Darmstadt, D
physiologische Kochsalzlösung		Baxter München, D
Povidon-Iod-Lösung	Braunoderm [®]	Braun Melsungen, D
Salzsäure 1N (1mol/l)		Merck Darmstadt, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Handelsname	Firma, Sitz
Bindfaden		Coats GmbH Kenzingen, D
Combi-Stopper		Braun, Melsungen, D
Dreiwegehahn	Discofix [®]	Braun, Melsungen, D
Einmalhandschuhe	SensiClean [®]	Ansell Surbiton Surrey, UK
Einmalspritze 1 ml, 2 ml	Inject Luer [®]	Braun, Melsungen, D
Haushaltsbindfaden Nr. 12		
Kanüle 26 G (0,9 mm x 25 mm)	BD Microlance 3 [®]	Becton Dickinson GmbH Heidelberg, D
Medizinisches Klebeband	Durapore [®]	3M St. Paul, MN, USA
Mulltupfer 20 x 20 cm, pflaumengroß		Beese Barbüttel, D
Operationsbesteck		Martin Medizintechnik Tuttlingen, D
Perfusorleitung 150 cm		Braun, Melsungen, D
Ratten-Immobilisator	Broome Rodent Restrainer [®]	Harvard Apparatus March-Hugstetten, D
Trachealtubus	aus BD Microlance 3 [®] 15 G gekürzt auf 1,5 cm	Becton Dickinson GmbH Heidelberg, D
Venenverweilkanüle 20 G und 22 G	Vasocan Braunüle [®]	Braun, Melsungen, D
Wärmeunterlage	Thermo-Lux [®]	Witte und Suttor Murrhardt, D
Zellstofftupfer 5 x 4 cm	Purzellin [®]	Lohmann und Rauscher Rengsdorf, D
Zellulose- Handtücher		Tork Mannheim, D
Zelluloseunterlage		

2.1.5 Geräte und Maschinen für Tierpräparation

Gerät / Maschine	Handelsname	Firma, Sitz
Beatmungspumpe	SAR-830/P Ventilator®	IITH Inc. Life Science Woodland Hills, CA, USA
Blutanalysegerät ABL 500		Radiometer Copenhagen, DN
Blutanalysegerät OSM 2	Hemoximeter®	Radiometer Copenhagen, DN
Computer mit Monitor		
Druckwandler	Combitrans Monitoring Set Mod. II for arterial blood pressure measurement	Braun, Melsungen, D
PET-Schläuche mit unterschiedlichen Durchmessern		Braun, Melsungen, D
Schleuse Einführungsbesteck mit venös hämostatischem Ventil 5F	Intradyn®	Braun, Melsungen, D

2.1.6 Histologie

Substanzen	Handelsname	Firma, Sitz
Avidin-Biotin- Blocking Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, D
DAB Substrat Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, D
Dinatriumhydrogen-phosphat		Merck Darmstadt, D
Ethanol 70%, 96%, 99,6% vergällt mit Ethylmethylketon		Fischer Saarbrücken, D
Formaldehyd säurefrei > 37%		Roth Karlsruhe, D
Isopropanol 99,8%		Fluka Chemie Buchs, CH
Kaliumdihydrogen-phosphat		Merck Darmstadt, D
Kernechtrot Aluminiumsulfat		Chroma Münster, D

Methanol reinst		Fluka Chemie Buchs, CH
Methylgrün Counterstain		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, D
Natriumchlorid		Roth Karlsruhe, D
Normal Goat Serum		Alexis Biochemicals Grünberg, D
Normal Horse Serum		Alexis Biochemicals Grünberg, D
Normal Rabbit Serum		Alexis Biochemicals Grünberg, D
Pikrinsäure wässrig, gesättigt		Fluka Chemie Buchs, CH
Resorcin Fuchsin		Chroma Münster, D
Rotihistol		Roth Karlsruhe, D
Trypsin	Digest All 2 [®]	Zytomed Berlin, D
Vectastain Elite ABC Kits anti-mouse, anti-rabbit, anti-horse		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, D
VIP Substrat Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, D
Wasserstoffperoxid 30%		Merck Darmstadt, D
Xylol		Roth Karlsruhe, D
Zymed Kit anti-rabbit		ZYMED Laboratories San Francisco, CA, USA
Materialien / Geräte		
Deckgläser verschieden Größen		R. Langenbrink Emmendingen, D
Digitale Kamera	DC 300F	Leica Microsystems Nussloch, D
Eindeckmedium xylollöslich	Pertex [®]	Medite GmbH Burgdorf, D
Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems Nussloch, D
Microtomklingen S 35		Feather, Japan über Medizin AG Köln, D
Objektträger	Superfrost Plus [®]	R. Langenbrink Emmendingen, D
Objektträgerstrecktisch	HI 1220	Leica Microsystems Nussloch, D
Parafilm		American National Can Menasha, Wisc, USA

Parafinausgießstation	EG 1140H	Leica Microsystems Nussloch, D
Parafineinbettmedium	Paraplast Plus®	Sigma Aldrich Steinheim, D
Parafinstreckbad	HI1210	Leica Microsystems Nussloch, D
Rotationsmikrotom vollautomatisch	RM 2165	Leica Microsystems Nussloch, D
Stereomikroskop Durchlicht	DMLA	Leica Microsystems Nussloch, D
Universal-Einbettkassetten mit Deckel		Leica Microsystems Nussloch, D
Urinbecher mit Deckel 100ml		
Vakuumgewebeeinfiltrationsautomat	TP 1050	Leica Microsystems Nussloch, D

2.1.7 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma, Sitz
Anti-alpha-smooth muscle actin; Clone 1A4 monoclonal, mouse anti-human	1 : 1000	Sigma Aldrich Steinheim, D
Anti-von Willebrand Faktor polyklonal, rabbit anti-human	1 : 1000	Dako Cytomation Hamburg, D
Anti-5-HT _{2A} Receptor; polyclonal, rabbit anti-rat	1 : 100	ImmunoStar, Inc. Hudson, WI, USA

2.1.8 Geräte, Software, Makros für Gefäßmorphometrie

	Bezeichnung	Firma, Sitz
Computer	Q 550 IW	Leica Microsystems Nussloch, D
Software	Q Win V3	Leica Microsystems Nussloch, D
Makros - für Wandstärke - für Muskularisierung		Leica Microsystems Nussloch, D

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Albino-Ratten verwendet. Albinoratten wurden ursprünglich aus der Wanderratte (*Rattus norvegicus*) gezüchtet und der für die Versuche gewählte Auszuchtstamm Sprague-Dawley wurde 1925 von Robert W. Dawley aus einer weiblichen Wistar-Ratte und einer männlichen Hybridratte entwickelt.

Gezüchtet und geliefert wurden die Tiere von Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland unter der Handelsbezeichnung CD[®]-Ratte.

Zu Beginn der Versuche betrug das Alter der Tiere etwa 12 Wochen und sie hatten ein Gewicht von 300-350 g.

Die Tiere wurden für die Dauer der Versuche im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin der Medizinischen Klinik II der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten. Die Gruppengröße betrug 5 Ratten pro Käfig, mit einer Käfiggröße von 32 x 52 cm. Die Futter- und Wasseraufnahme erfolgte ad libitum, in Form von pelletiertem Standarddiätfutter (Teklad Global 2018[®], Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln) und Leitungswasser.

Der Tag- und Nachtrhythmus, d.h. die Licht- und Dunkelphase betrug je 12 Stunden, die mittlere Umgebungstemperatur ca. 22 °C.

Alle Versuche wurden durchgeführt entsprechend der nationalen Tierschutzrichtlinien. Die Genehmigung für die Durchführung der Versuche erfolgte vom Regierungspräsidium Gießen.

Der dazu gehörende Tierversuchsantrag „Tergurid in pulmonaler Hypertonie“ kann unter dem Aktenzeichen GI 20/10 Nr. 03/2007 eingesehen werden.

2.2.2 Monocrotalin zur Induktion einer pulmonalen Hypertonie

Zur Zubereitung der Injektionslösung wurden 250 mg kristallines Monocrotalin abgewogen und in 3 ml 1N HCl restlos gelöst. Danach wurde die Lösung mit 2 ml 1N NaOH auf einen pH von ca. 7,4 eingestellt.

Die Ratten erhielten eine Kurznarkose mit Isofluran über einen Wattebausch, wurden gewogen und erhielten dann eine Injektion von 60 mg/kg Körpergewicht (KG) Monocrotalin subkutan in die Nackenfalte.

Eine Gruppe mit gesunden Kontrolltieren erhielt das gleiche Volumen an isotoner Kochsalzlösung.

An Tag 2 wurden die Tiere umgesetzt, Einstreu, Futter und Wasser wurden unschädlich entsorgt. Sowohl die MCT-Tiere, als auch die Kontrollratten erhielten von Tag 2 - 15 Enrofloxacin 2,5% als orale Lösung über das Trinkwasser in einer Dosierung von 2 ml/500 ml Wasser. Dadurch wurden Sekundärinfektionen und inflammatorische Lungenveränderungen weitestgehend verhindert.

2.2.3 Behandlung mit Tergurid

Tergurid lag als kristalline Reinsubstanz (Lieferant Firma Ergonex Pharma) vor.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden 30 ml 0,1 M NaOAc vorbereitet. Hierzu wurden 0,4083 g Sodiumacetat in 30 ml destilliertem Wasser gelöst. Davon wurden 27,82 ml mit 132,18 ml Aqua dest. zu insgesamt 160 ml NaAc-Stocklösung zusammengeführt. Die Lösung wurde 14 Tage bei Raumtemperatur gelagert.

Des Weiteren wurden alle drei Tage 48 mg Tergurid abgewogen und in 4,8 ml Ethanol 99,6 % gelöst und im Kühlschrank aufbewahrt.

Aus diesen zwei Lösungen wurde dann zweimal täglich eine Suspension aus 0,8 ml Tergurid-Stock und 3,2 ml NaAc-Stock hergestellt. Die Ratten erhielten 2 x täglich je nach Dosierungsgruppe 0,4 mg oder 1,2 mg pro kg Körpergewicht als intraperitoneale Injektion. Dies entsprach je nach Dosierung und Gewicht einem Volumen von 0,08 ml – 0,4 ml Injektionslösung. Die Kontrolltiere erhielten das entsprechende Volumen eines Gemisches aus 99 % Ethanol und gelöstem Sodiumacetat.

2.2.4 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden in acht Gruppen eingeteilt.

Bis auf die Tiere der Kontrollgruppe A1 erhielten alle Ratten zu Beginn der Versuchsreihe eine einmalige subkutane Injektion von 60 mg/kg KG Monocrotalin.

A: Kontrollgruppen

1. gesunde Kontrollen mit einmaliger subkutaner Injektion von NaCl an Tag 1

2. Erzeugung pulmonaler Hypertonie durch Monocrotalin

Kontrollen 2 Wochen nach s.c. Injektion von 60 mg/kg KG Monocrotalin an Tag 1

B: präventive Gruppen:

3. Plazebo 0 - 4

Kontrollen 4 Wochen nach s.c. Injektion von 60 mg/kg KG Monocrotalin und 2 x täglicher i.p. Injektion von einem NaAc-Ethanolgemisch von Woche 0 - 4

4. Tergu 0 - 4 (0,8 mg/kg Tag)

Therapiegruppe von Woche 0 – 4 mit 2 x täglicher i.p. Injektion von 0,4 mg/kg KG Tergurid

5. Tergu 0 - 4 (2,4 mg/kg Tag)

Therapiegruppe von Woche 0 – 4 mit 2 x täglicher i.p. Injektion von 1,2 mg/kg KG Tergurid

C: kurative Gruppen:

6. Plazebo 2 - 4

Kontrollen 4 Wochen nach s.c. Injektion von 60 mg/kg KG Monocrotalin und 2 x täglicher i.p. Injektion von einem NaAc-Ethanolgemisch von Woche 2 - 4

7. Tergu 2 - 4 (0,8 mg/kg Tag)

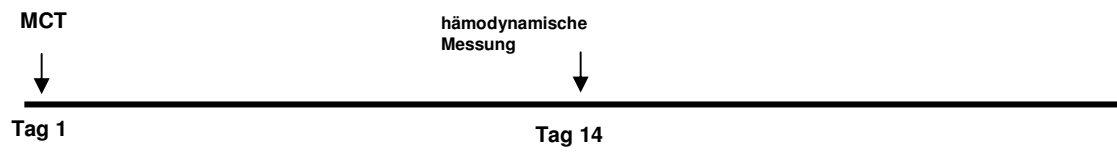
Therapiegruppe von Woche 2 – 4 mit 2 x täglicher i.p. Injektion von 0,4 mg/kg KG Tergurid

8. Tergu 2 - 4 (2,4 mg/kg Tag)

Therapiegruppe von Woche 2 – 4 mit 2 x täglicher i.p. Injektion von 1,2 mg/kg KG Tergurid



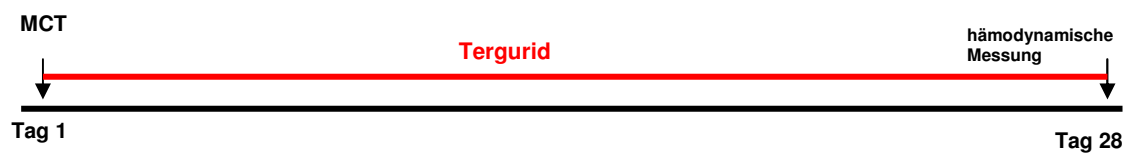
gesunde Kontrollen,
n = 6



Kontrollen **2 Wochen** nach
Monocrotalin-Injektion,
n = 6



Plazebokontrollen **4 Wochen** nach
Monocrotalin-Injektion
n = 6



Tergurid Woche 0 - 4,
2 x 0,4 mg/kg KG
n = 6

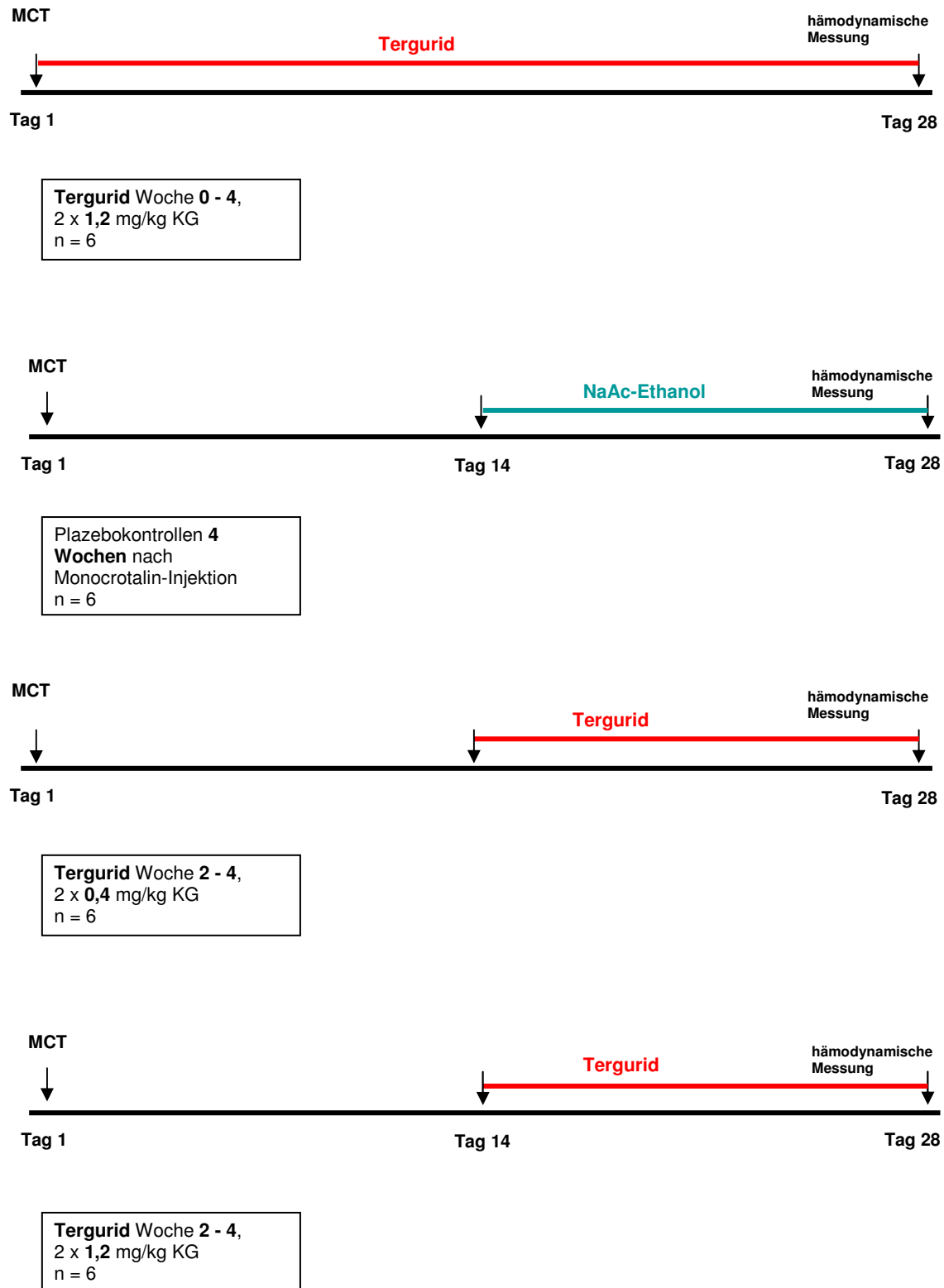


Abbildung 7: Darstellung der Versuchsgruppen

2.2.5 Hämodynamische Messungen

2.2.5.1 Versuchsvorbereitungen

Vor Versuchsbeginn wurden die Schleuse, die Zugänge und Schläuche sowie die Druckwandler zur einwandfreien Druckübertragung luftblasenfrei gespült, das Programm Labtech Pro[®] gestartet und die Ausgangswerte für SAP, RVSP und VP gegen den Luftdruck auf 0 mm Hg kalibriert.

Die Ratten wurden gewogen und entsprechend ihrem Gewicht die Narkose vorbereitet.

2.2.5.2 Narkose

Anästhesiert wurden die Ratten mit 50 mg/kg KG Ketamin und 100 µg/kg KG Medetomidin. Zur intraperitonealen Injektion wurden sie im Ratten-Immobilisator „Restrainer“ fixiert. Nach Eintritt des Narkoseschlafes erhielten die Tiere eine intramuskuläre Injektion von 250 µg/kg KG Atropinsulfat zur Reduzierung vasovagaler Reflexe während der Manipulation an der Arteria Carotica.

Der ausreichende Verlust des Bewusstseins und des Schmerzempfindens wurde anhand des Fehlens des Corneal- und Lidreflexes sowie des Fehlens einer Reaktion auf mehrmaliges festes Kneifen in den Zwischenzehenbereich sichergestellt.

Zur Erhaltung der physiologischen Körpertemperatur wurden die Tiere auf einer 40°C warmen Heizplatte fixiert.

2.2.5.3 Beatmung

Vor Eröffnung der Haut wurde das Fell im ventralen Halsbereich mit Braunol[®]-Lösung befeuchtet, damit während der Präparation das Operationsfeld nicht durch Haare verunreinigt wird. Danach wurde in diesem Bereich mit einer Präparationsschere ein etwa 1 x 1 cm großes Hautstück entfernt. Durch stumpfe Präparation mit zwei Pinzetten wurde die Trachea freigelegt und mit einer untergeschobenen Pinzette vorgelagert. Zwischen zwei Knorpelspangen wurde die

Trachea inzisiert und nach Einschalten der Beatmungspumpe der Tracheotubus hier eingeführt und mit einem Bindfaden fixiert.

Die Beatmungsmaschine arbeitete mit einer Frequenz von 60 Zügen pro Minute und einem konstanten Atemzugvolumen von 3 ml. Ein endexpiratorischer Druck von 1 cm Wassersäule verhindert ein Kollabieren der Alveolen in der maschinellen Expiration.

2.2.5.4 Präparation der Vene und Arterie

Die rechte Vena Jugularis wurde kranial des Brusteingangs vom Bindegewebe isoliert und vorgelagert, dann wurden zwei Bindfäden untergelegt. Der kraniale Bindfaden wurde gezogen, sodass der vom Kopf kommende Blutfluss unterbunden wurde. Weiterhin wurde der Faden nach kranial gespannt und mit einem Klebestreifen fixiert, um das Einführen der Schleuse in die gestreckte Vene zu erleichtern. Anschließend erfolgte eine Inzision der Vena Jugularis und die Öffnung wurde mit einer spitzen Pinzette offen gehalten. Mittels eines flexiblen Führungsdrahts wurde die Schleuse inklusive Mandrin in die Vene Richtung kaudal eingeführt. Der kaudale Bindfaden wurde gezogen um den Sitz der Schleuse zu fixieren, Führungsdraht und Mandrin wurden aus der Schleuse entfernt.

Die linke Arteria Carotica wurde von den umliegenden Muskelschichten befreit und ebenfalls vorgelagert, der ihr anhängende Nervus Vagus wurde vorsichtig durchtrennt. Von zwei unterlegten Bindfäden wurde wie bei der Vene der kraniale gezogen und die Arterie unter Spannung fixiert. Um den vom Herzen kommenden Blutfluss zu unterbinden wurde nah am Brusteingang ein Arterienclip angeklemt. Danach wurde die Arterie inzisiert. Eine 22G Braunüle® ohne Nadel wurde mit einem Dreiwegehahn gekoppelt und mit Hilfe eines flexiblen Führungsdrahts nach kaudal in die Inzision eingeführt. Auch hier wurde der kaudale Bindfaden gezogen, um den Zugang zu fixieren, der Führungsdraht entfernt, der Dreiwegehahn geschlossen und der Arterienclip gelöst.

Sowohl der venöse als auch der arterielle Zugang wurden mit 200 µl NaCl-verdünntem Heparin (1:20) gespült.

2.2.5.5 Druckmessungen

Die Messwertübertragung funktionierte über je einen arteriellen und venösen flüssigkeitsgefüllten Druckaufnehmer, sowie einen luftgefüllten Druckaufnehmer für den Ventilationsdruck. Deren analoge Signale wurden im Druckwandler verstärkt und in digitale Signale umgewandelt, so dass sie durch das Programm Labtech Pro aufgezeichnet werden konnten.

Zur Kontrolle des systemisch arteriellen Drucks (SAP) wurde der arterielle Druckaufnehmer an den Dreiwegehahn des arteriellen Zugangs angeschlossen.

Ein über einen Dreiwegehahn mit dem venösen Druckaufnehmer verbundener Rechtsherzkatheter wurde durch das Rückschlagventil der Schleuse in die Vena Jugularis eingeführt. Durch vorsichtiges Vorschieben und Kontrolle der kontinuierlichen venösen Druckaufzeichnung wurde der Katheter über die Vena Cava in den rechten Ventrikel positioniert. Die charakteristische Druckkurve bestätigte den korrekten Sitz.

Die dargestellten Werte wurden aufgezeichnet, abgespeichert und ausgedruckt.

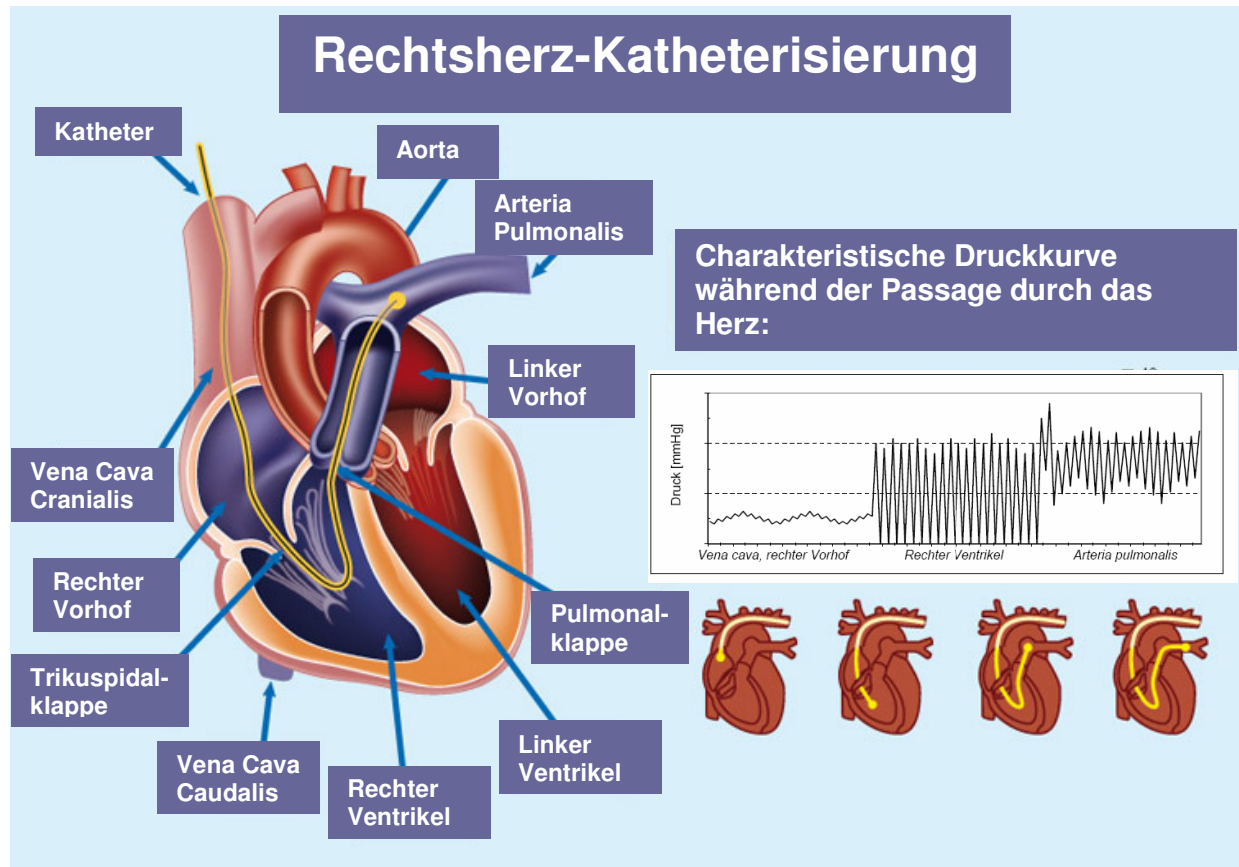


Abbildung 8: Rechtsherzkatheterisierung: Charakteristische Druckkurve

Während der Lage des Katheters in der Vena Jugularis, der Vena Cava oder im rechten Vorhofs imponiert eine typische dreigipflige und atemverschiebbliche Druckkurve. Nach dem Einführen in den rechten Ventrikel erscheint die charakteristische pulsatile Druckkurve, welche bei gesunden Ratten systolisch Spitzenwerte von 20-25 mmHg aufweist (modifiziert nach www.pah-info.com).

2.2.5.6 Probenentnahmen

Nach einer ausreichend langen Aufzeichnung der Drücke, wurden 400 µl gemischtvenöses Blut aus dem rechten Ventrikel und 400 µl plus weitere 2 ml arterielles Blut aus der Arteria Carotica entnommen und bis zur Messung auf Eis gekühlt. Mit einem Messgerät des Typ ABL 500 wurden jeweils die arteriellen und venösen Parameter für pO₂, pCO₂ und pH-Wert, mit einem OSM 2 Hämoximeter die Werte für Hämoglobingehalt und O₂-Sättigung gemessen. Die verbliebenen 2 ml Blut wurden in Eppendorftubes umgefüllt und bei 4°C für 10 Minuten bei 1000

Umdrehungen zentrifugiert und das überstehende Plasma aufgesogen und bei -20 °C tiefgefroren.

Zur Entnahme der Lunge wurde das Fell an Thorax und Abdomen mit Braunol befeuchtet und ein Hautschnitt vom Hals bis zum Processus Xyphoideus und von da links und rechts am Rippenbogen entlang geführt. Nach geringer Freipräparation der Bauchdecke wurde diese mit der gleichen Schnittführung eröffnet. Mittels einer Klemme wurde das Xyphoid fixiert und durch Wegschneiden des Diaphragmas und Durchtrennen des Sternums in der Medianen bis zur Apertura Thoracis Cranialis wurde die Brusthöhle dargestellt. Zur besseren Sicht wurden die Rippenbögen seitlich weggeklappt und mit Darmklemmen fixiert.

Um die Lungengefäße von Blut freizuspülen wurde die Arteria Pulmonalis inzidiert und ein kleines Abflussloch in den linken Ventrikel geschnitten. In die Inzision wurde ein mit NaCl-Lösung gefüllter Schlauch eingeführt und die Lunge mit einem Druck von 22 cm Wassersäule gespült.

In einer Phase der Inspiration wurde die Trachea abgeklemmt und die Beatmung ausgeschaltet. Der rechte Lungenflügel wurde am Hilus ligiert und entnommen. Bis zur molekularbiologischen Weiterverwendung wurde er in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C gelagert.

Der linke Lungenflügel wurde über die Inzision in der Arteria Pulmonalis ca. 5 Minuten mit Zamboni's Fixativ (Formaldehyd 2 %, Picrinsäure 15 % in 0,1 mol/l Phosphat Puffer) (Zamboni et al. 1967) bei einem Druck von 22 cm Wassersäule gespült. Auch er wurde entnommen, über Nacht bei 4 °C in Zamboni fixiert und dann in 0,1 M PBS überführt und gelagert.

Das Herz wurde an seiner Basis von den Gefäßen getrennt und entnommen, die Atrien und Herzklappen weggeschnitten und der rechte Ventrikel wurde exakt entlang des Septums abgetrennt. Der linke Ventrikel verblieb am Septum und beide Ventrikel wurden 14 Tage bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.5.7 Berechnungen

Als Maß für die Rechtsherzhypertrophie wurde der Quotient der Trockengewichte des rechten Ventrikels und des linken Ventrikels plus Septum bestimmt.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Gewicht RV (g)}}{\text{Gewicht LV+S (g)}}$$

Das Herzzeitvolumen (HZV), als die vom Herzen ausgeworfene Blutmenge in ml/min, ist eine wichtige kreislaufphysiologische Messgröße. Neben dem Hämoglobingehalt des Blutes und der Sauerstoffsättigung ist es einer der wesentlichen Faktoren für die Sauerstoffversorgung des Organismus.

Das Herzzeitvolumen berechnet sich nach dem Fick'schen Prinzip. Danach lässt sich der Blutfluss aus dem Quotient einer zugeführten Substanz (Sauerstoffaufnahme) und dem Konzentrationsunterschied zwischen zu- und abführendem Gefäß errechnen.

$$\text{HZV} = \frac{\text{Sauerstoffaufnahme}}{(\text{art. O}_2\text{-Sättigung} - \text{ven. O}_2\text{-Sättigung})}$$

2.2.6 Histologie und Immunhistologie

2.2.6.1 Vorbereitungen

Die mit Zamboni fixierten und in PBS gelagerten Lungenlappen wurden parallel zur Diaphragmafläche in ca. 3 mm dicke Scheiben geschnitten, die Scheiben in Einbettkassetten verbracht und im Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten dehydriert. Zur endgültigen Fixation wurden sie in Parafin eingegossen.

Als Vorbereitung zur Färbung wurde von den zuvor gekühlten Parafinblöcken entsprechend der Schnittflächen 3 µm dünne Schnitte angefertigt, diese wurden in ein 40°C warmes Wasserbad verbracht und von dort auf Objektträger gezogen.

Zur Anheftung auf dem Objektträger wurden sie anschließend bei 37°C 24 Stunden getrocknet.

Histopuffer für die immunhistochemischen Färbungen wurde aus PBS mit 3 % bovinen Serumalbumin (BSA) und 0,2 % Triton x 100 hergestellt.

BSA wurde zur Verdünnung für die Antikörper mit PBS auf 10 % herunterverdünnt.

2.2.6.2 Elastica-Kernechtrot-Färbung

Zur Bestimmung der mittleren Wandstärke wurden die Schnitte nach dem Protokoll der Elastica-Kernechtrot-Färbung wie folgt gefärbt:

Zum Endparaaffinieren kamen die Schnitte für insgesamt 25 Minuten in Rotihistol, danach folgte zum Rehydrieren eine absteigende Alkoholreihe (2 x Ethanol 99,6 %, Ethanol 96 %, Ethanol 70 %) für je 2 Minuten.

Anschließend wurden die Lungenschnitte 16 Stunden in Resorcin-Fuchsin gefärbt. Nach Abspülen mit Aqua dest. wurde 10 Minuten mit Kernechtrot Aluminiumsulfat gegengefärbt und wieder mit Aqua dest. abgespült. Zum Dehydrieren durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe und erneut Rotihistol, dann wurden sie mit einem harzigen Medium (Pertex®) eingedeckt.

2.2.6.3 Immunhistologie

2.2.6.3.1 Immunhistochemische Doppelfärbung

Zur Bestimmung des Muskularisierungsgrad wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung gegen alpha smooth muscle actin und von Willebrand Faktor nach folgendem Protokoll durchgeführt:

25 Minuten	Rotihistol	entparaaffinieren
20 Minuten	Absteigende Alkoholreihe	rehydrieren
15 Minuten	20 ml 30% H ₂ O ₂ + 190 ml Methanol	Block endogener Peroxidasen
5 Minuten	Aqua dest.	spülen
5 Minuten	PBS	spülen Anm.: ab hier wird nach jedem Schritt (außer nach Blockierung unspez. Bindungen mit Serum) je 3 x 5 Minuten mit PBS gespült!
10 Minuten	Trypsin Digest All® 1:3	proteolytische Demaskierung bei 37 °C
30 Minuten	1 : 1 : 2 Horse Serum, Goat Serum, Histopuffer	Block unspezifischer Bindungen mit Serum

30 Minuten	1 : 1000 anti-alpha smooth muscle actin, Histopuffer	Bindung 1. Primärantikörper
20 Minuten	Vectastain ABC Elite Kit horse anti-mouse	biotinylierter Sekundärantikörper
20 Minuten	ABC - Reagenz	aus Vectastain ABC Elite Kit
ca. 1 Minute	Vector VIP®	violettes Chromogen
5 Minuten	Aqua dest.	spülen
15 Minuten	Avidin Reagenz	Block endogenen Avidins
15 Minuten	Biotin Reagenz	Block endogenen Biotins
30 Minuten	1 : 1000 anti-von Willebrand Faktor, Histopuffer	Bindung 2. Primärantikörper
20 Minuten	Vectastain ABC Elite Kit goat anti-rabbit	biotinylierter Sekundärantikörper
20 Minuten	ABC - Reagenz	aus Vectastain ABC Elite Kit
15 Sekunden	Vector DAB®	braunes Chromogen
1 Minute	Methylgrün	Gegenfärbung der Zellkerne
1 Minute	Aqua dest.	spülen
14 Minuten	aufsteigende Alkoholreihe	dehydrieren
10 Minuten	Rotihistol	
5 Minuten	Xylol	
	Pertex® harziges Medium	eindecken

2.2.6.3.2 Immunhistochemische Färbung des 5HT_{2A}-Rezeptors

Die Einleitung erfolgte ebenfalls nach dem in Punkt 2.2.6.3.1 beschriebenen Protokoll. Nach der proteolytischen Demaskierung mit Trypsin und erneutem Spülen mit PBS wurde nach folgendem Protokoll gefärbt:

60 Minuten	BSA 10%	
20 Minuten	Horse Serum 2,5%	Block unspezifischer Bindungen mit Serum
über Nacht	1 : 100 anti-5HT _{2A} -Receptor-Antikörper, BSA 10%	Bindung 1. Primärantikörper
30 Minuten	ImmPRESS REAGENT anti-rabbit IG Peroxidase	biotinylierter Sekundärantikörper
5-15 Minuten	NovaRED - Substrat	

5 Minuten	Leitungswasser	
1 Minute	Aqua dest.	spülen
1-3 Minuten	Hämatoxylin	
kurz	Leitungswasser	spülen
1 Minute	PBS	
1 Minute	Aqua dest.	
4 Minuten	Ethanol 96%	dehydrieren
10 Minuten	Isopropylalkohol	dehydrieren
15 Minuten	Xylol	
	Pertex® harziges Medium	eindecken

2.2.7 Morphometrische Analyse der Lungengefäße

2.2.7.1 Mittlere Wandstärke

Die Analysen der Wandstärke und des Muskularisierungsgrades wurden mittels eines Analysesystems (Leica Q Win Standart Analyzing Software), mit einer Kombination aus einer Digitalkamera und einem Computer mit von der Firma Leica speziell für die Gefäßmorphometrie entwickelten Makros, durchgeführt.

Zudem wurden die Schnitte ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit analysiert.

Die laut Protokoll der Elastica-Kernechtrot-Färbung gefärbten Schnitte wurden hinsichtlich der Wandstärke der Lungengefäße ausgewertet. Pro Lunge wurden bei 400x, 200x und 100x Vergrößerung je 80-100 Gefäße ausgezählt und vom Computerprogramm anhand des externen Gefäßdurchmessers in drei Kategorien eingeteilt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass in Kategorie I und II je eine Mindestanzahl von 30-40 Gefäßen zustande kam, in Kategorie III eine Mindestanzahl von 10-20 Gefäßen.

Kategorie I: externer Gefäßdurchmesser von 25 – 50 µm

Kategorie II: externer Gefäßdurchmesser von 51 – 100 µm

Kategorie III: externer Gefäßdurchmesser >101 µm

Der externe Gefäßdurchmesser umfasste den Bereich innerhalb der Lamina Elastica Externa.

Zur Berechnung der mittleren Wandstärke wurde ebenfalls die Mediadicke hinzugezogen. Diese wurde definiert als der mittlere Abstand (Mittelwert aus 3 – 5 Messungen pro Gefäß) zwischen Lamina Elastica Interna und Lamina Elastica Externa.

Die mittlere Wandstärke wurde dann als Prozentsatz des größten externen Gefäßdurchmessers angegeben und wie folgt berechnet:

$$\begin{array}{lcl} \text{Prozent mittlere} & & \\ \text{Wandstärke} & = & \frac{2 \times \text{Mediadicke}}{\text{externer Gefäß-}} \times 100 \\ (\% \text{ MWST}) & & \text{durchmesser} \end{array}$$

2.2.7.2 Muskularisierungsgrad

Die nach der immunhistochemischen Doppelfärbung gegen smooth muscle alpha actin und von Willebrand Faktor VIII gefärbten Schnitte wurden hinsichtlich des Muskularisierungsgrades der Gefäßwände ausgewertet. Bei 400facher Vergrößerung wurden pro Lunge 100 Gefäße in der Größe von 25 µm bis 50 µm ausgezählt und vom Computerprogramm nach folgenden Kriterien kategorisiert:

- voll muskularisiert = der Anteil an smooth muscle alpha actin positiven Bereichen (violett) in der Gefäßmedia beträgt > **75%**
- partiell muskularisiert = der Anteil an smooth muscle alpha actin positiven Bereichen (violett) in der Gefäßmedia beträgt **5 - 75%**
- nicht muskularisiert = der Anteil an smooth muscle alpha actin positiven Bereichen (violett) in der Gefäßmedia beträgt < **5%**

Das Analysesystem unterschied hierfür die violette Färbung der glatten Muskelzellen (angefärbt durch Antikörper gegen smooth muscle alpha actin) und die braune Färbung der Endothelschicht (gefärbt durch Antikörper gegen den von Willebrand Faktor).

Die Identifizierung und Berechnung der Farben wurde halbautomatisch, d.h. mit zusätzlichem Vergleich der Berechnung des Computers mit dem Bild unter dem

Lichtmikroskop, in einer colorimetrisch-spektrometrischen Rechnung von der Spezialsoftware durchgeführt.

Alle berechneten Werte, d.h. mittlere Wandstärke in % und absolut, Muskularisierungsgrad in %, Innendurchmesser, Außendurchmesser und Lumenfläche wurden vom Computerprogramm direkt in Exceltabellen überführt und gespeichert.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die Auswertung aller Daten wurde mit der Statistiksoftware Instat anhand von Mittelwerten (MW) der gemessenen Werte und deren Standardfehler (SEM) durchgeführt. Die Werte waren normalverteilt und die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurde durch Varianzanalyse und durch einen Student-Newman-Keuls post-hoc Test für multiple Vergleiche errechnet. Hierbei wurde ein p-Wert <0.05 als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Überlebensrate im Vergleich zwischen mit Tergurid behandelten Tieren und Plazebotieren

In den mit dem NaAc-Ethanolgemisch behandelten Monocrotalin-Gruppen war die Überlebensrate nach 4 Wochen MCT und zusammen gesehen 2 und 4 Wochen Plazebothherapie 66,7%, d.h. 8 von 12 Tieren überlebten.

In den von Woche 0 - 4 präventiv mit Tergurid mit einer Dosis von 0,4 mg und 1,2 mg/kg KG behandelten Gruppen betrug die Überlebensrate vier Wochen nach MCT-Injektion 100%, es überlebten 12 von 12 Ratten. Das gleiche Ergebnis lag bei der kurativen Therapiegruppe mit einer Terguridbehandlung von Woche 2 – 4 mit einer Dosis von 1,2 mg/kg KG vor, 6 von 6 Tieren überlebten.

Lediglich in der Gruppe der von Woche 2 – 4 mit einer Dosis von 0,4 mg/kg KG behandelten Ratten lag eine Überlebensrate von 83,3% vor, 5 von 6 Ratten überlebten.

Die mit der Plazebolösung behandelten Monocrotalin-Kontrolltiere zeigten im Verlauf der Behandlung ein deutlich eingeschränktes Allgemeinbefinden und klinische Anzeichen einer pulmonalen Hypertonie. Sie litten unter Gewichtsverlust, waren apathisch mit deutlich vermindertem Pflgetrieb und zeigten eine pumpende Atmung, Zyanosen der Schleimhäute sowie Gesichtsödeme.

Bei der Sektion der verstorbenen Tiere fielen eine Hypertrophie des rechten Ventrikels, eine dilatierte Pulmonalarterie, gestaute Venen und eine Stauungsleber auf. Bei 3 Tieren lag ein mittel- bis hochgradiger nicht eitriger Thoraxerguss vor, bei 2 Tieren ein klarer Erguss in der Bauchhöhle.

Bei der Probenentnahme nach Hämodynamik der Tergurid-behandelten Ratten lagen deutlich weniger imposante Veränderungen an den Organen vor. Lediglich ein leicht vergrößerter rechter Vorhof konnte bei 3 Tieren beobachtet werden.

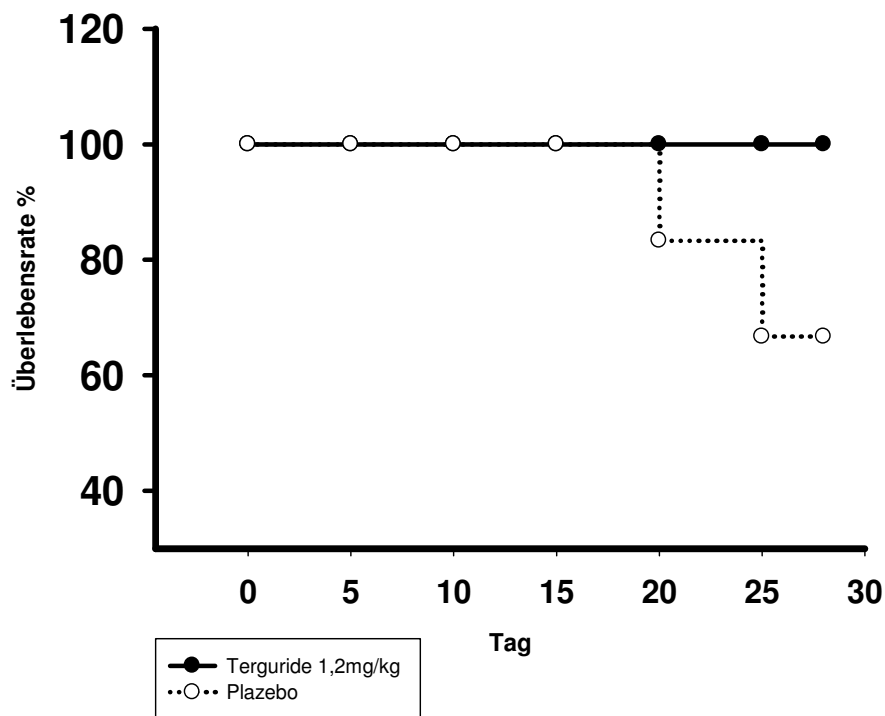


Abbildung 9: Darstellung der Überlebensrate in % der mit Tergurid mit einer Dosis von 1,2 mg/kg KG behandelten Ratten im Vergleich zu mit einem NaAc - Ethanolgemisch behandelten Kontrolltieren.

3.2 Nebenwirkungen der Tergurid-behandelten Ratten

In keiner der mit Tergurid behandelten Gruppen traten Nebenwirkungen auf.

Lediglich das vor Erreichen der Woche 4 verstorbene Tier zeigte in der Sektion gestaute, hervorgetretene Hoden. Bei Anschnitt dieser konnten jedoch keine Veränderungen festgestellt werden.

Bei einigen Tieren wurden beim Eröffnen der Bauchhöhle kleine Hämatome in der Bauchdecke festgestellt, die auf die intraperitonealen Injektionen zurückzuführen sind.

3.3. Körpergewicht

Die Ratten der präventiven Therapiegruppe mit einer Terguriddosis von 1,2 mg/kg Körpergewicht 2 x täglich hatten zu Beginn ein gemittelt Gewicht von 397 g.

Während der Therapie stieg das Gewicht im Mittel über 415 g an Tag 15 bis zu 427 g bei Versuchsende.

Die Tiere der Plazebokontrollgruppe nahmen anfänglich auch zu, im Mittel von 430 auf 440 g bis zu Tag 15, dann folgte jedoch eine starke Gewichtsreduktion auf nur noch 421 g an Tag 28.

Die Veränderung des Körpergewichts entsprach bei der Plazebogruppe folglich einer gemittelten Abnahme von 3,66%, wohingegen die Therapiegruppe eine gemittelte Zunahme von 7,56% aufwies.

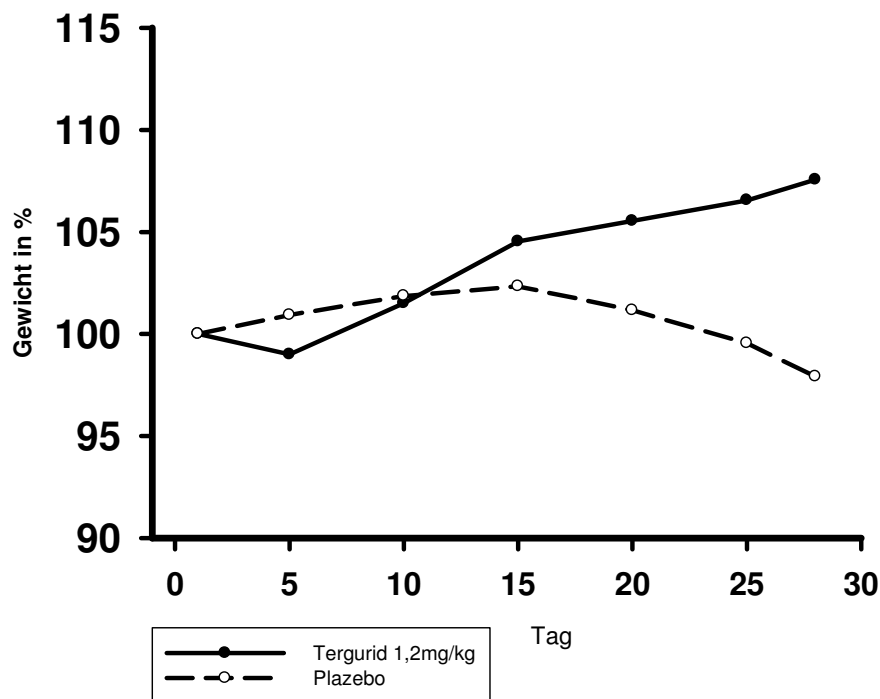


Abbildung 10: Darstellung des Gewichtsverlaufs in %, ausgehend von Anfangsgewicht der mit Tergurid mit einer Dosis von 1,2 mg/kg KG behandelten Ratten im Vergleich zu mit einem NaAc - Ethanolgemisch behandelten Kontrolltieren.

3.4 Systemisch-arterieller Druck (SAP)

Die unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit den verschiedenen Dosierungen behandelt wurden, hatten alle einen mittleren systemisch-arteriellen Druck von 103 ± 4 mm Hg und unterschieden sich somit nicht signifikant voneinander.

Man kann also davon ausgehen, dass Tergurid keinen Einfluss auf den SAP und folglich keine systemische vasodilatative Wirkung hat.

Die mit dem NaAc-Ethanolgemisch behandelte Kontrollgruppe zeigte zwei Wochen nach der MCT-Injektion einen mittleren Druck von 117 ± 8 mm Hg, die Kontrolltiere nach vier Wochen einen Druck von 112 ± 5 mm Hg. Bei der gesunden Kontrollgruppe ergab sich ein mittlerer SAP von 110 ± 8 mm Hg.

Es lag folglich auch im Vergleich zwischen den Therapie- und den Kontrollgruppen kein signifikanter Unterschied des mittleren systemisch-arteriellen Drucks vor.

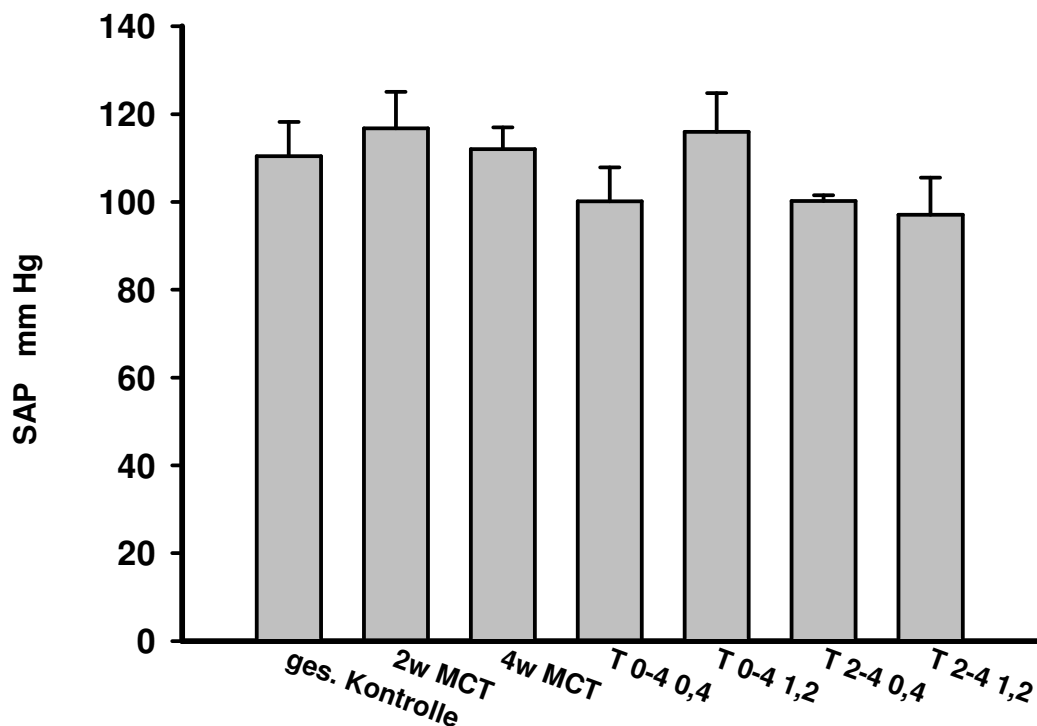


Abbildung 11: Darstellung des systemisch-arteriellen Druckes in den folgenden Gruppen:
gesunde Tiere, Plazebokontrollen 2 und 4 Wochen nach MCT-Injektion, präventive Therapie mit 0,4 mg/kg und 1,2 mg/kg KG und kurative Therapie mit 0,4 mg/kg und 1,2 mg/kg KG.

3.5 Rechtsventrikulärer Druck (RVSP)

Zur Erfassung des RVSP wurde eine invasive Druckmessung durchgeführt. Hierzu wurde unter kontinuierlicher Druckaufzeichnung ein Katheter intravenös über die Vena Jugularis in den rechten Ventrikel eingeführt und der dort gemessene Druck über 10 bis 15 Minuten aufgezeichnet.

Ausgehend von einem physiologischen Druck der gesunden Kontrolltiere von $26,1 \pm 1,5$ mm Hg lässt sich im Krankheitsverlauf eine Erhöhung des Druckes über $35,8 \pm 4,3$ mm Hg zwei Wochen bis hin zu einem Druck von $66,1 \pm 5,5$ mm Hg vier Wochen nach der MCT-Gabe feststellen.

Unter der Therapie mit Tergurid zeigten sich deutliche dosisabhängige Veränderungen des rechtsventrikulären Druckes. Während in der niedrigen Dosierung von 0,4 mg/kg KG unabhängig von dem Therapiezeitraum keine signifikanten Unterschiede zu den Placebotieren festzustellen waren, lagen die rechtsventrikulären Drücke der höher dosierten Gruppe mit 1,2 mg/kg KG deutlich niedriger und unterschieden sich nicht mehr signifikant von den Werten gesunder Ratten.

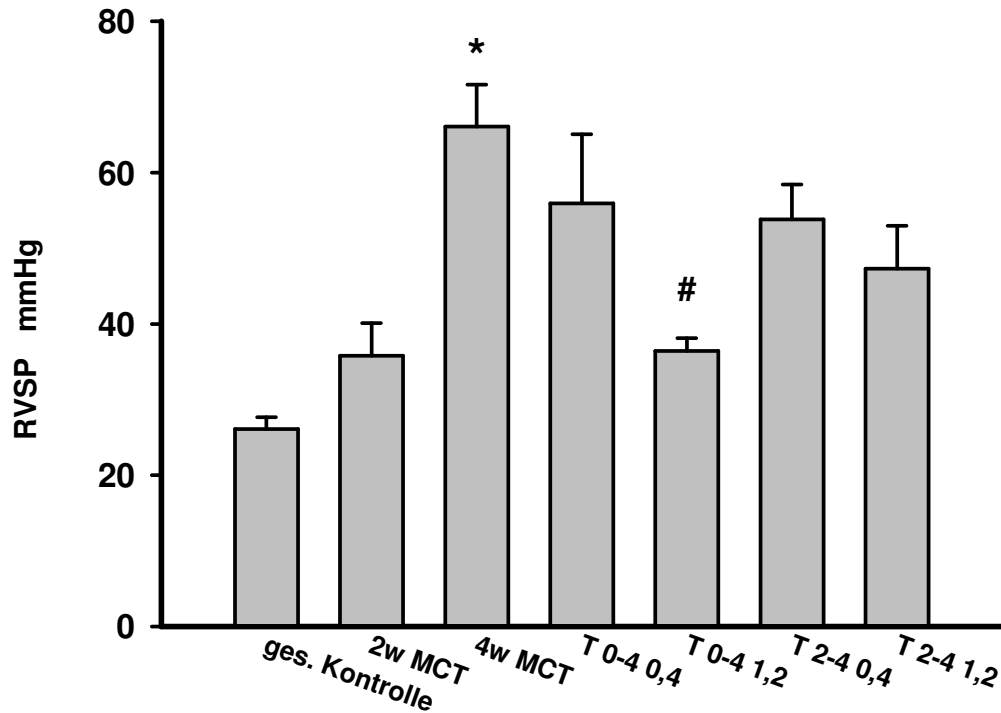


Abbildung 12: Darstellung des rechtsventrikulären systolischen Druckes bei invasiver Messung in den folgenden Gruppen:
 gesunde Tiere, Plazebokontrollen 2 und 4 Wochen nach MCT-Injektion, präventive Therapie mit 0,4 mg/kg und 1,2 mg/kg KG und kurative Therapie mit 0,4 mg/kg und 1,2 mg/kg KG
 (* $p < 0,05$ vs. gesund, # $p < 0,05$ vs. 4w MCT).

3.6 Verhältnis des rechten Ventrikels zum linken Ventrikel plus Septum (RV/SV+S)

Ein Maßstab für den Schweregrad des pulmonalen Hochdrucks ist die Rechtsherzhypertrophie. Um diese zu erfassen wurde das Verhältnis der Trockengewichte des rechten Ventrikels und des linken Ventrikels plus Septum bestimmt (Ratio).

Dieser Quotient lag bei der gesunden Kontrollgruppe bei $0,30 \pm 0,01$ und stieg mit Entwicklung der PAH bei den Kontrollgruppen von $0,38 \pm 0,02$ zwei Wochen auf $0,71 \pm 0,03$ vier Wochen nach MCT Injektion.

Alle mit Tergurid behandelten Therapiegruppen zeigten eine signifikante Erniedrigung der Ratio, wobei sich die präventiven Gruppen nicht signifikant von der gesunden Kontrollgruppe unterschieden und die kurativen Gruppen mit den Vergleichswerten zum Therapiestart zwei Wochen nach MCT-Injektion korrelierten.

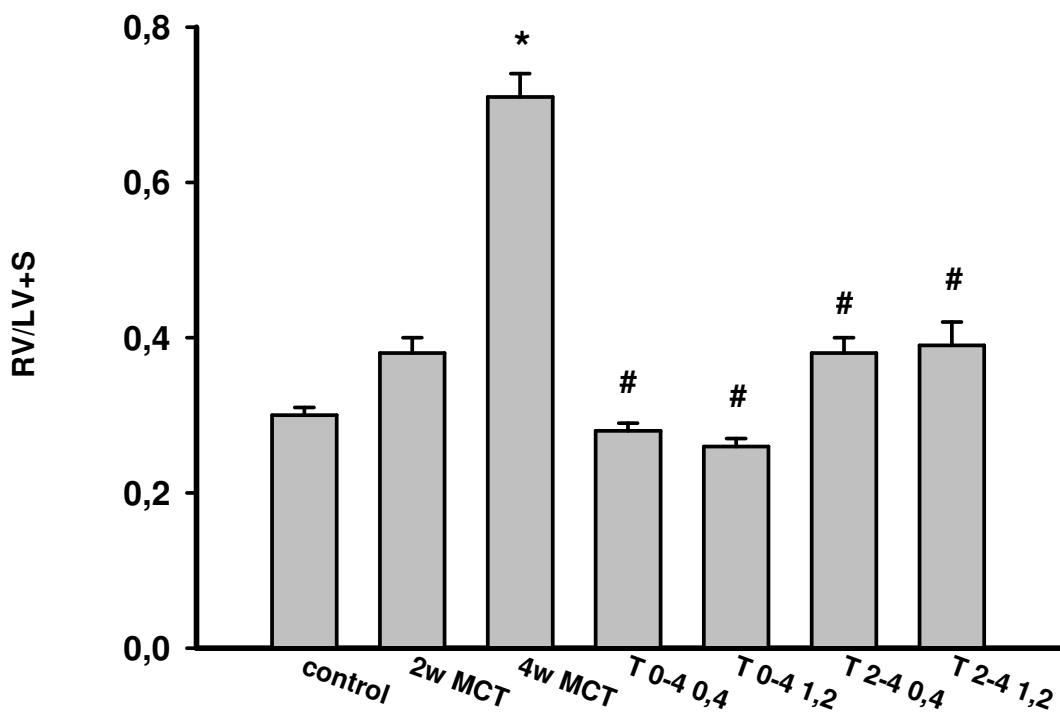


Abbildung 13: Darstellung des Verhältnisses des rechten Ventrikels zum linken Ventrikel plus Septum als Maß für die Rechts-herzhypertrophie in den einzelnen Gruppen (* $p < 0,05$ vs. gesund, # $p < 0,05$ vs. 4w MCT).

3.7 Herzzeitvolumen (HZV)

Das HZV ist ein Maß für die Sauerstoffversorgung des Organismus. Es gibt die vom Herz ausgeworfene Blutmenge in ml/min bezogen auf 100 g Körpergewicht (Cardiac Index) an.

Unter dem Einfluss von Monocrotalin verminderte sich der Cardiac Index von $36,0 \pm 1,4$ ml/min bei gesunden Tieren auf einen Wert von $34,4 \pm 5,4$ ml/min zwei Wochen nach der Gabe. Im zeitlichen Verlauf verschlechterte er sich signifikant weiter auf $28,0 \pm 2,4$ ml/min vier Wochen nach der Injektion.

Die präventive Therapie mit Tergurid von Woche 0-4 mit einer Dosis von 1,2 mg/kg KG erhöhte den Cardiac Index signifikant auf $36,2 \pm 0,5$ ml/min 100g.

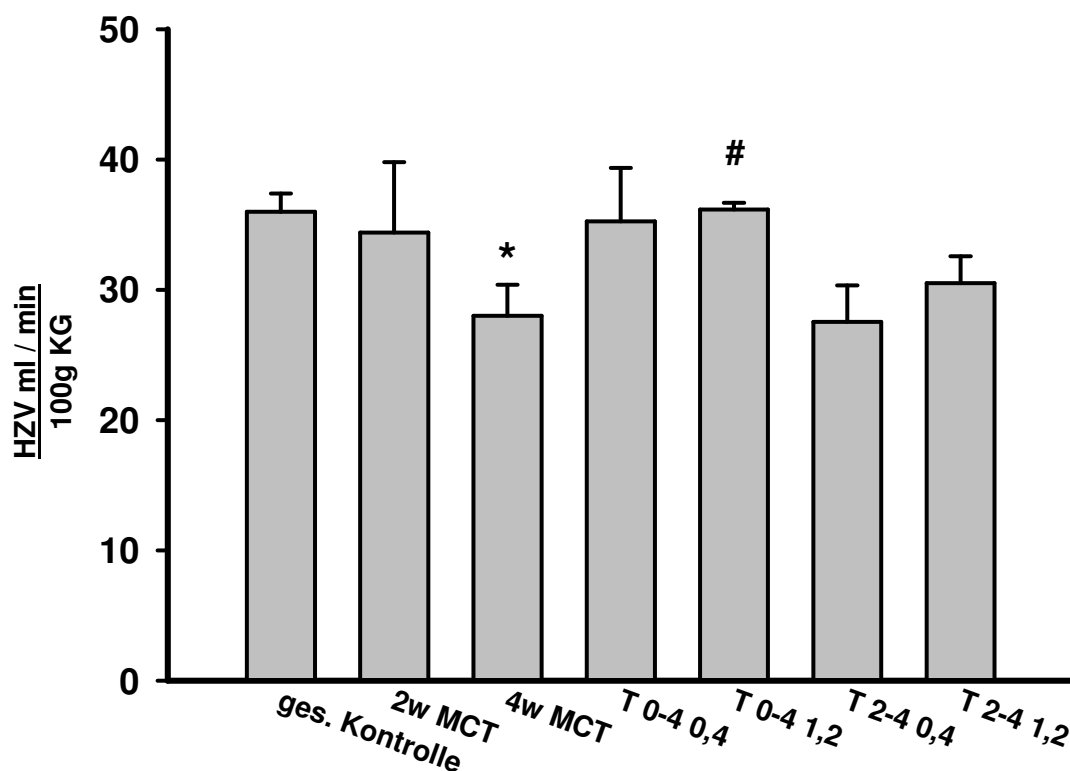


Abbildung 14: Darstellung des Cardiac Index

(Herzzeitvolumen bezogen auf 100 g Körpergewicht)

in den einzelnen Gruppen

(* $p < 0,05$ vs. gesund, # $p < 0,05$ vs. 4w MCT).

3.8 Morphometrische Analyse der Lungengefäße

3.8.1 Mittlere Wandstärke

Der Verlauf der PAH und des vaskulären Remodelings lässt sich durch die Messung der mittleren Wandstärke der Media der Lungengefäße darstellen.

Um die Veränderung morphometrisch quantifizieren zu können, wurden Lungenschnitte der einzelnen Versuchsgruppen mit einer Elastica-Kernechtrot-Färbung gefärbt und mit Hilfe einer speziellen Software der Firma Leica Microsystems ausgewertet.

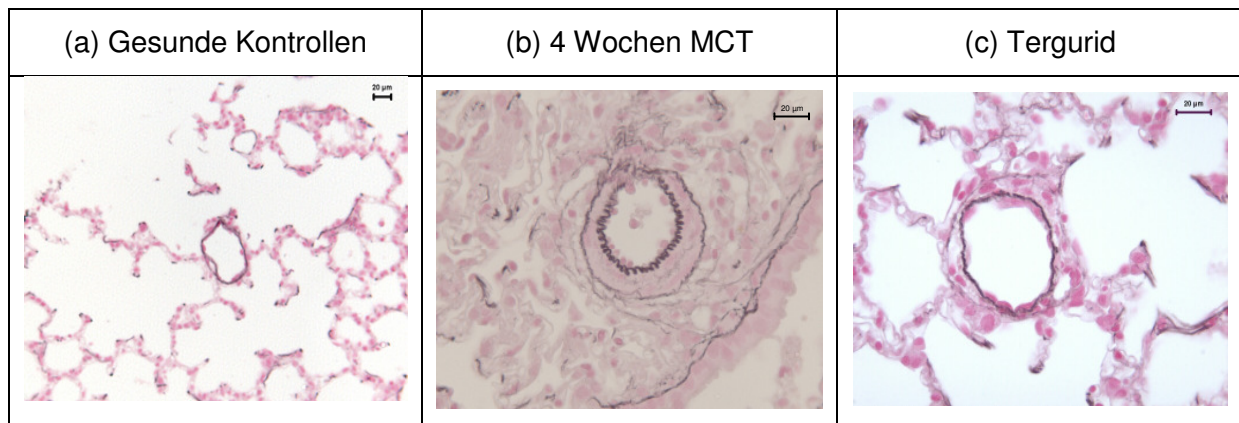


Abbildung 15: Elastica-Kernechtrot-Färbung pulmonaler Gefäße der einzelnen Versuchsgruppen.

Lamina elastica externa und interna färben sich grau-schwarz, Zellkerne rot.

- (a) physiologisch dünne Gefäßwände,
 - (b) progressive Verdickung im Verlauf der PAH,
 - (c) Regression unter Therapie mit Tergurid
- (400x Vergrößerung)

3.8.1.1 Distale Pulmonalarterien von 25 - 50 μm

Die mittlere Wandstärke der Pulmonalarterien mit einem externen Durchmesser zwischen 25 und 50 μm betrug bei gesunden Kontrolltieren $18,6 \pm 0,4$ % des größten externen Querdurchmessers.

Im Verlauf der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie unter Einfluss von Monocrotalin erhöhte sich die Wandstärke auf ein Mittel von $26,0 \pm 0,4$ % zwei Wochen nach der Injektion und stieg weiter auf $28,7 \pm 0,3$ % vier Wochen nach der Gabe von MCT.

Nach Therapie mit Tergurid unterschied sich die mittlere Wandstärke bei Pulmonalarterien dieser Größe sowohl in den präventiven, als auch in den kurativen Versuchsgruppen signifikant von den Werten der Placebokontrollen.

In der präventiven Therapiegruppe lag die mittlere Wandstärke bei einer Dosis von 2 x täglich 0,4 mg/kg KG bei $19,9 \pm 0,3$ % und in der höheren Dosierung von 1,2 mg/kg Kg bei $20,4 \pm 0,3$ % und unterschied sich damit nicht signifikant von den Ergebnissen gesunder Ratten.

Auch unter der kurativen Therapie von Woche 2 - 4 nach MCT-Gabe betrug die mittlere Wandstärke bei der niedrigen Dosis von 0,4 mg/kg KG $22,8 \pm 0,4$ % und bei einer Dosis von 1,2 mg/kg KG $22,1 \pm 2,1$ % und erreichte folglich annähernd physiologische Werte.

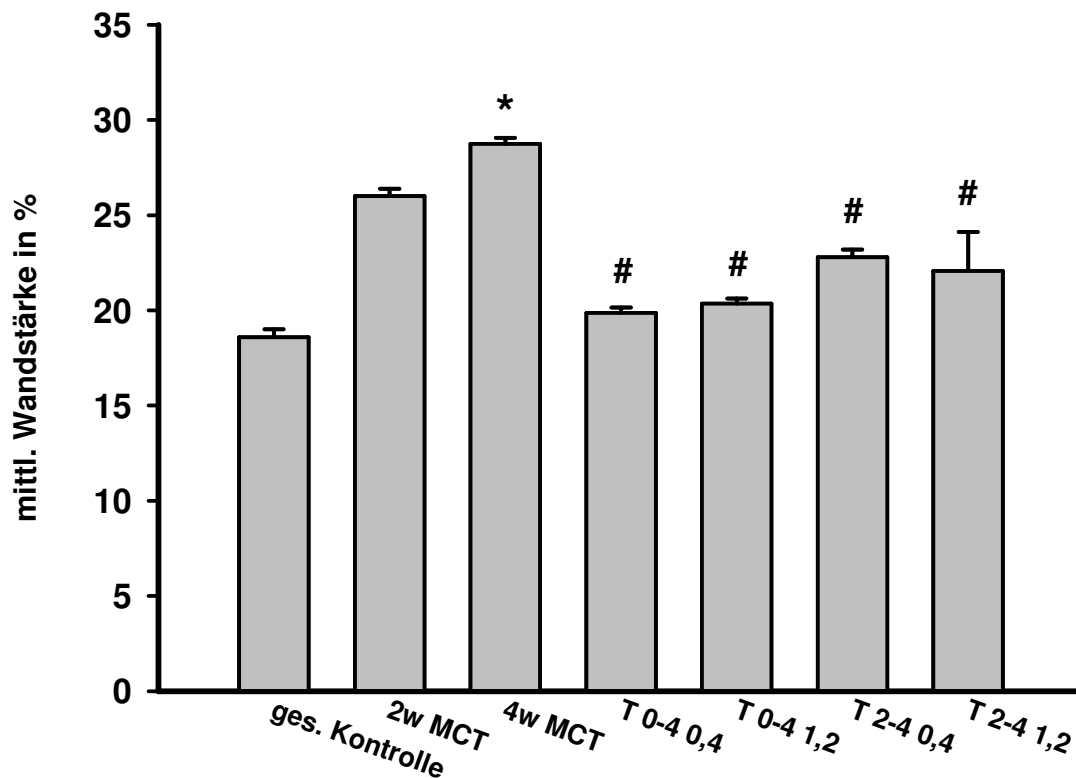


Abbildung 16: Darstellung der mittleren Wandstärke in distalen kleinen Pulmonalarterien mit einem externen Durchmesser von 25 - 50 μm . Angabe in % des größten externen Querdurchmessers, ausgewertet wurden folgende Versuchsgruppen: gesunde Tiere, Plazebokontrollen 2 und 4 Wochen nach MCT-Injektion, präventive Therapie mit 0,4 mg/kg und 1,2 mg/kg KG und kurative Therapie mit 0,4 mg/kg und 1,2 mg/kg KG
(* $p < 0,05$ vs. gesund, # $p < 0,05$ vs. 4w MCT).

3.8.1.2 Mittelmäßige Pulmonalarterien von 50 - 100 μm

Bei den Pulmonalarterien mit einem externen Durchmesser zwischen 50 und 100 μm betrug die mittlere Wandstärke in Prozent des größten externen Querdurchmessers bei gesunden Ratten $17,0 \pm 0,4$ %.

Im Krankheitsverlauf stieg die Wandstärke über $20,0 \pm 0,3$ % zwei Wochen nach MCT-Injektion auf $23,0 \pm 0,5$ % vier Wochen nach MCT-Gabe.

Durch die präventive Therapie mit Tergurid konnte bei beiden Dosierungen eine Verdickung der Gefäßwand verhindert werden. Die Werte bei der niedrigen Dosis betrugen $18,5 \pm 0,4$ %, bei der hohen Dosis $18,6 \pm 0,3$ % und stellten keinen signifikanten Unterschied zu den gesunden Tieren dar.

Die kurative Therapie führte zu einem Stillstand der Veränderung der Gefäßwände. Die mittlere Wandstärke mit $20,2 \pm 0,4$ % bei 0,4 mg/kg KG und $19,5 \pm 0,5$ % bei 1,2 mg/kg KG korrelierte mit den Ergebnissen zu Therapiebeginn zwei Wochen nach der MCT-Injektion.

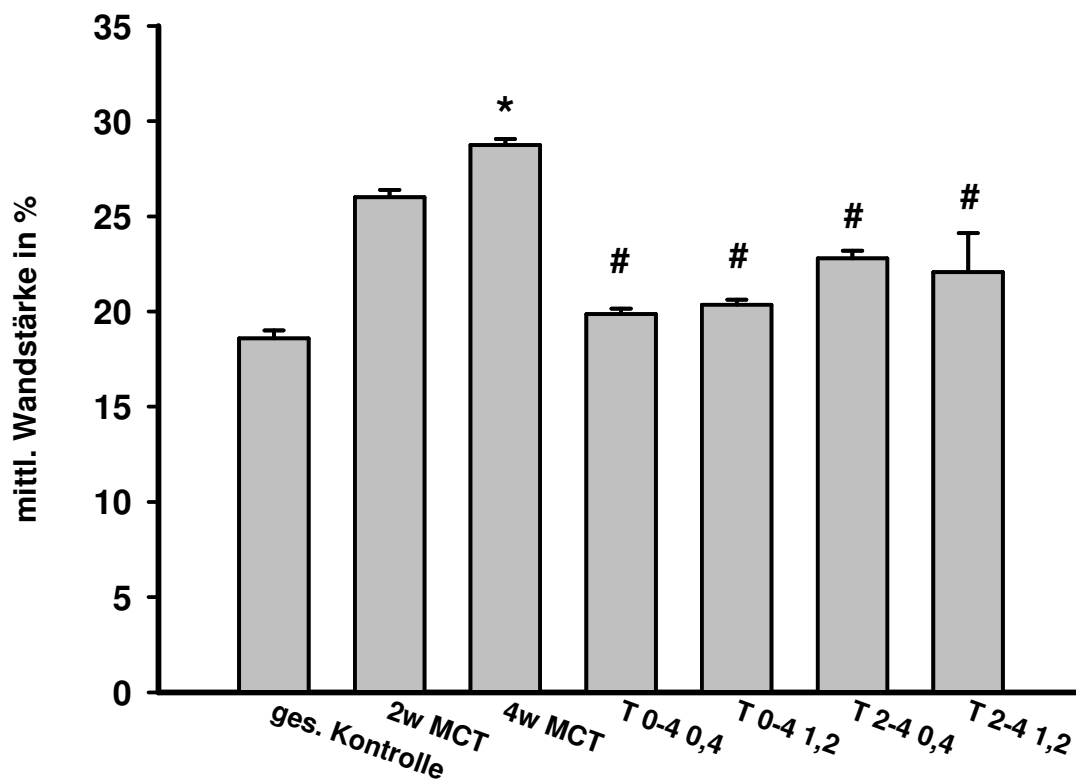


Abbildung 17: Darstellung der mittleren Wandstärke in mittelgroßen Pulmonalarterien mit einem externen Durchmesser von 50 - 100 μm . Angabe in % des größten externen Durchmessers, ausgewertet wurden folgende Versuchsgruppen: gesunde Tiere, Plazebokontrollen 2 und 4 Wochen nach MCT-Injektion, präventive Therapie mit 0,4 mg/kg und 1,2 mg/kg KG und kurative Therapie mit 0,4 mg/kg und 1,2 mg/kg KG (* $p < 0,05$ vs. gesund, # $p < 0,05$ vs. 4w MCT).

3.8.1.3 Große Pulmonalarterien von > 100 µm

Die mittlere Wandstärke der großen Pulmonalarterien mit einem externen Durchmesser größer als 100 µm betrug bei gesunden Kontrolltieren $15,1 \pm 1,1$ % des größten externen Querdurchmessers.

Die Verdickung der Wände war in den großen Gefäßen weniger deutlich zu beobachten, die mittlere Wandstärke stieg vier Wochen nach der MCT-Injektion auf $18,5 \pm 0,7$ %.

Obwohl sich die Vorgänge des Remodelings hauptsächlich in den distalen Pulmonalarterien vollziehen, ließ sich auch in den größeren Gefäßen eine Reduktion der Wandstärke unter Einfluss von Tergurid erkennen. Die gemessenen Gefäße der therapierten Tiere hatten zusammengefasst eine mittlere Wandstärke von $14,9 \pm 0,8$ % und entsprachen somit denen der gesunden Tiere. Bis auf die Werte der Tiere der kurativen Gruppe mit der niedrigen Dosis unterschied sich die mittlere Wandstärke aller Gruppen signifikant von den Werten der Tiere der Placebogruppen.

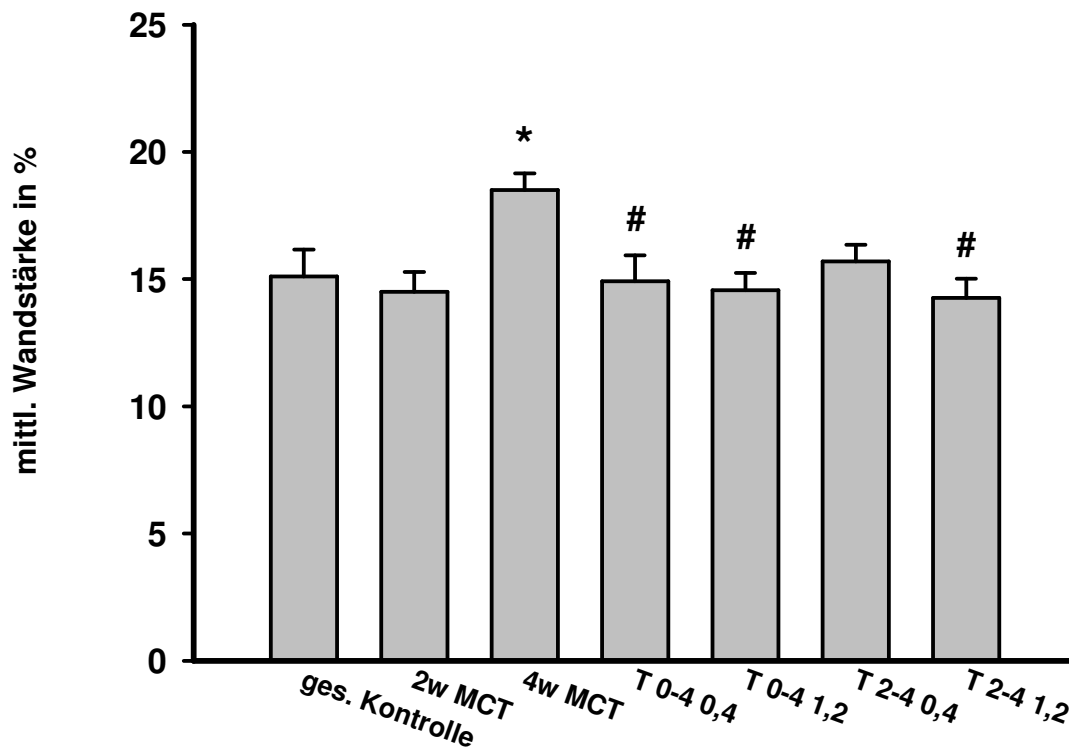


Abbildung 18: Darstellung der mittleren Wandstärke in großen Pulmonalarterien mit einem externen Durchmesser von $> 100 \mu\text{m}$. Angabe in % des größten externen Durchmessers, ausgewertet wurden folgende Versuchsgruppen: gesunde Tiere, Plazebokontrollen 2 und 4 Wochen nach MCT-Injektion, präventive Therapie mit 0,4 mg/kg und 1,2 mg/kg KG und kurative Therapie mit 0,4 mg/kg und 1,2 mg/kg KG (* $p < 0,05$ vs. gesund, # $p < 0,05$ vs. 4w MCT).

3.8.2 Muskularisierungsgrad

Im Verlauf der PAH und des vaskulären Remodelings lässt sich neben einer Zunahme der Wandstärke ein Anstieg des Muskularisierungsgrades der arteriellen Lungengefäße feststellen.

Um die Veränderung in den einzelnen Gruppen sichtbar zu machen, wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung von den Lungenschnitten gemacht. Die

immunhistochemische Peroxidase-Färbung gegen glattmuskuläres Alpha-actin wurde mit einem violetten Chromogen (Vector VIP®) entwickelt, die Färbung gegen den endothelialen von Willebrand Faktor wurde mit einem braunen Chromogen (Vektor DAB®) entwickelt.

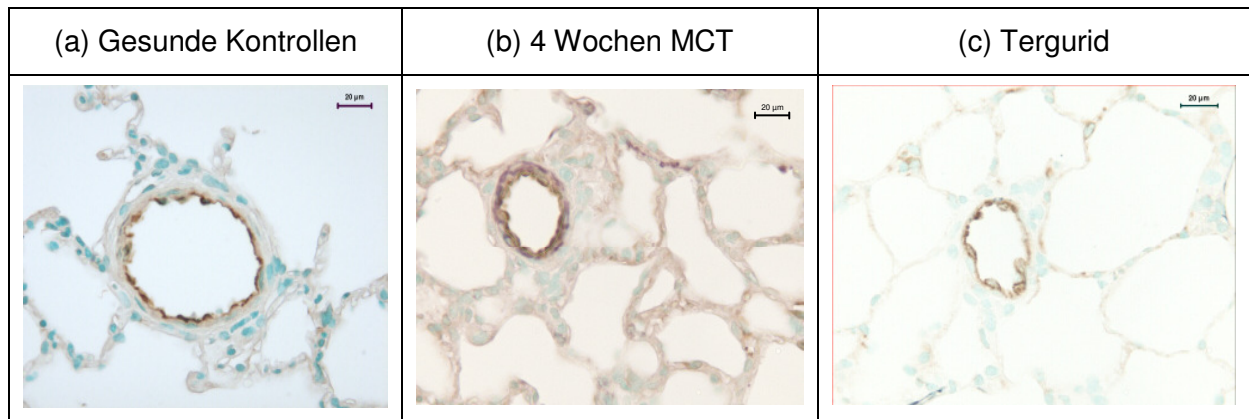


Abbildung 19: Immunhistochemische Doppelfärbung pulmonaler Gefäße der einzelnen Versuchsgruppen. Smooth muscle alpha actin färbt sich violett, von Willebrand Faktor stellt sich braun dar.

(a) kleine periphere Arterien physiologisch nicht oder nur teil muskularisiert,

(b) progressive Zunahme der Muskularisierung im Verlauf der PAH,

(c) Regression unter Therapie mit Tergurid

Die Auswertung der Doppelfärbung erfolgte mit Hilfe einer speziellen Software der Firma Leica Microsystems, welche den Anteil der Violettfärbung (smooth muscle alpha actin) ermittelte. Pro Tier wurden je 100 periphere Lungenarterien zwischen 25 und 50 µm untersucht.

Die Pulmonalarterien der gesunden Kontrollratten waren mit $73,7 \pm 4,6 \%$ zu mehr als $2/3$ nicht muskularisiert, mit $26,0 \pm 4,5 \%$ waren weniger als $1/3$ partiell muskularisiert und mit $0,20 \pm 0,18 \%$ waren annähernd keine Gefäße voll muskularisiert.

Mit Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie nahm der Anteil der nicht muskularisierten Gefäße stark ab, zwei Wochen nach MCT-Injektion waren noch gut 1/3 der untersuchten Lungenarterien nicht muskularisiert ($34,3 \pm 6,4 \%$), nach vier Wochen nur noch $2,4 \pm 1,6 \%$. Zeitgleich stieg der Anteil der voll muskularisierten Pulmonalarterien stark an. Bei Therapieende nach vier Wochen waren $68,2 \pm 7,2 \%$, also mehr als 2/3 der Arterien der Plazebotiere voll muskularisiert.

Durch die präventive Therapie mit Tergurid konnte bei beiden Dosierungen eine signifikante Verringerung des Anteils der voll muskularisierten Gefäße erreicht werden. Der prozentuale Anteil vollmuskularisierter Gefäße bei der niedrigen Dosis betrug $21,5 \pm 3,4 \%$, bei der hohen Dosis sogar nur $16,7 \pm 2,2 \%$.

Die kurative Therapie führte zu weniger deutlichen Ergebnissen, jedoch war auch hier eine signifikante Reduzierung der voll muskularisierten Arterien zu beobachten.

Bei Versuchsende waren bei einer 2 x täglichen Dosis von 0,4 mg/kg KG mit $52,9 \pm 2,5 \%$ und bei einer Dosis von 2 x täglich 1,2 mg/kg KG mit $57,8 \pm 2,0 \%$ noch gut die Hälfte aller gemessenen Pulmonalarterien voll muskularisiert.

Der Anteil der teil muskularisierten, sowie der nicht muskularisierten Lungengefäße erhöhte sich in allen Therapiegruppen.

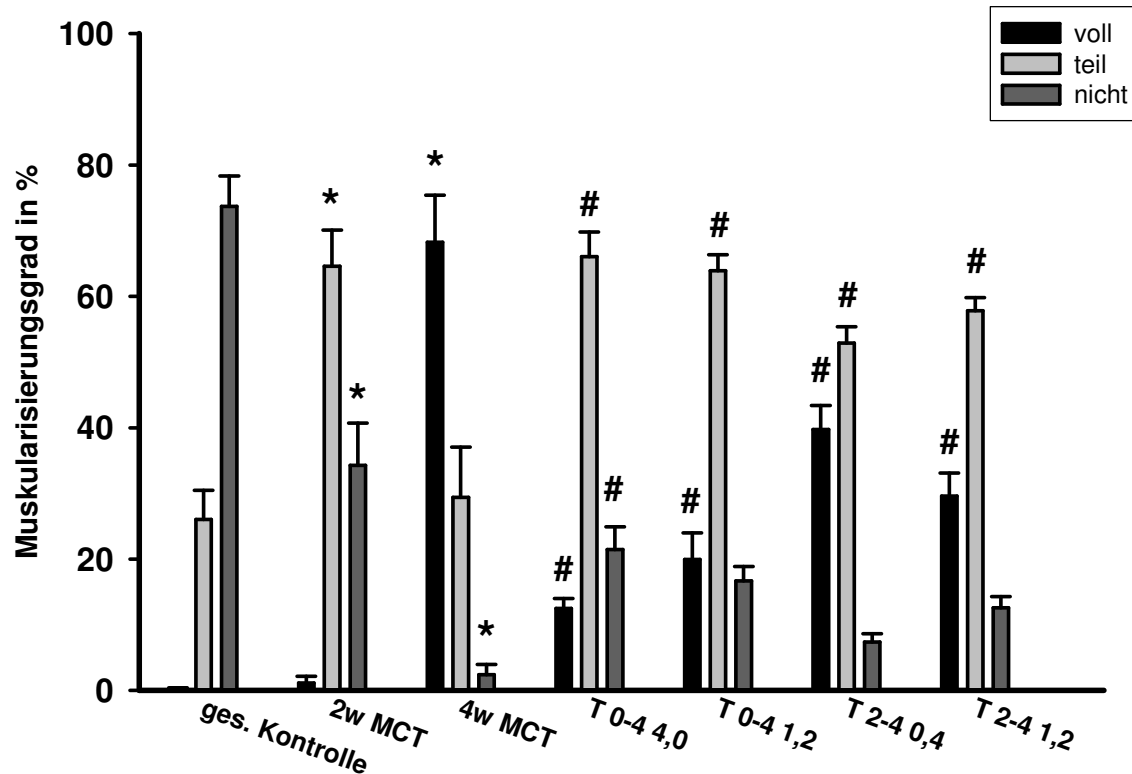


Abbildung 20: Darstellung des prozentualen Anteils nicht, teil oder voll muskularisierter Pulmonalarterien mit einem externen Querdurchmesser von 25 - 50 μm , ausgewertet wurden folgende Versuchsgruppen:
gesunde Tiere, Placebokontrollen 2 und 4 Wochen nach MCT-Injektion, präventive Therapie mit 0,4 mg/kg und 1,2 mg/kg KG und kurative Therapie mit 0,4 mg/kg und 1,2 mg/kg KG
(* $p < 0,05$ vs. gesund, # $p < 0,05$ vs. 4w MCT).

3.9 Expression des 5HT_{2A} Rezeptors in Rattenlungen

Um die Lokalisation und die Überexpression von 5HT_{2A}-Rezeptoren in den Pulmonalarterien der Versuchstiere nachzuweisen wurde eine immunhistochemische Peroxidase-Färbung von Lungenschnitten gesunder Ratten und von Tieren vier Wochen nach MCT-Injektion angefertigt.

Bei den erkrankten Ratten zeigte sich eine deutliche braunrote Färbung im Bereich der glatten Gefäßmuskulatur. Im Gegensatz dazu ließ sich bei den gesunden Kontrolltieren lediglich eine schwache Färbung der glatten Muskelzellen beobachten. In gesunden Ratten befinden sich folglich nur wenige 5HT_{2A}-Rezeptoren in den SMC, wohingegen es im Verlauf der Krankheitsentwicklung zu einer deutlichen Überexpression der Rezeptoren kommt.

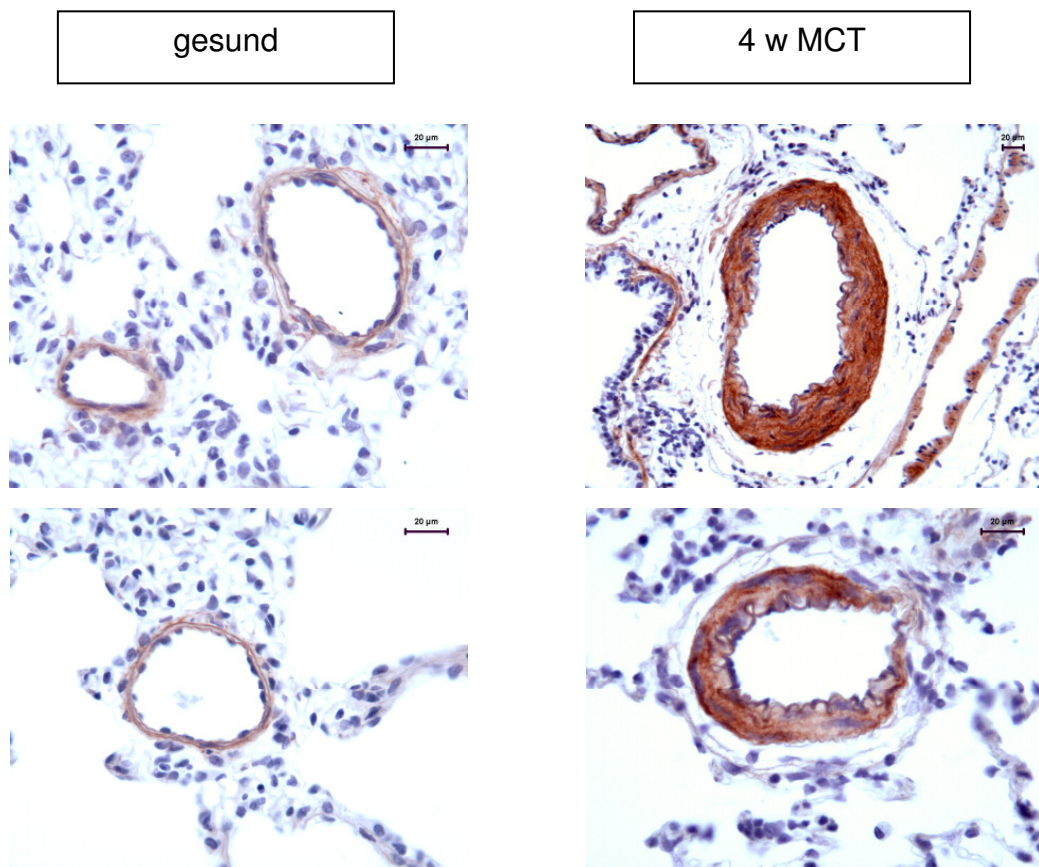


Abbildung 21: Darstellung der immunhistochemischen Färbung gegen 5-HT_{2A}-Rezeptoren in Lungen gesunder Ratten und vier Wochen nach Monocrotalin-Injektion.

4 Diskussion

4.1 Therapiemöglichkeiten der PAH

Die pulmonale Hypertonie ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, die durch einen Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes charakterisiert ist. Dieser Anstieg resultiert aus Endothelschäden, Zellproliferationen und aus einem erhöhten Vasotonus durch vermehrte Kontraktion glatter Muskelzellen. Unbehandelt führt die Erkrankung zu einem Rechtsherzversagen und schließlich zum Tod.

Frühere Behandlungsmöglichkeiten basieren auf gefäßerweiternden Medikamenten, die systemisch (intravenös) verabreicht wurden. Die Blutdrucksenkung findet hier gleichzeitig im Lungenkreislauf und im großen Körperkreislauf statt, was zu einem zum Teil lebensbedrohlichen systemischen Blutdruckabfall führen kann. Zudem kann es zu einer Verschlechterung des pulmonalen Gasaustausches kommen, da meist nicht nur vermehrte Vasokonstriktion die Ursache der PAH darstellt sondern eine proliferative Vaskulopathie vorliegt (Rubin 1997).

Wirkstoffe, die eine pulmonal-selektive Vasodilatation erzeugen, sind unter anderem Prostaglandine (Barst et al. 1996), die intravenös oder subkutan verabreicht werden können. Mittlerweile werden Prostanoiden wie Iloprost oder Treprostinol auch inhalativ verabreicht. Durch die direkte Inhalation hat man zwar die Möglichkeit selektiv den pulmonalarteriellen Druck zu verringern und auch den Gasaustausch zu verbessern, allerdings limitiert die kurze Halbwertszeit die Effizienz dieser Methode (Olschewski et al. 1996).

Weitere Substanzen sind Phosphodiesterasehemmer und Endothelinrezeptorantagonisten, die beide mit deutlichen Nebenwirkungen belastet sind.

Eine neue Therapiestrategie in der Behandlung der PAH ist der PDGF-Rezeptorantagonist Imatinib. Der Angriffspunkt liegt hierbei nicht mehr in der Vasodilatation, sondern viel mehr in der Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen. Dieser Ansatz zeigt gute Ergebnisse, es gibt keine signifikante Veränderung des systemisch arteriellen Druckes, die Reduktion des rechtsventrikulären Druckes ist ausschließlich auf die antiproliferative Wirkung zurückzuführen (Dony 2006).

Aus diesen Erkenntnissen entwickelte sich der Gedanke einen Wirkstoff zu finden, der sowohl pulmonalselektiv zu einer Vasodilatation führt, als auch eine ausgeprägte antiproliferative Wirkung hat.

Da Tergurid diese beiden Voraussetzungen zu erfüllen scheint, bietet sich dadurch ein viel versprechender therapeutischer Ansatzpunkt der pulmonalen Hypertonie.

4.2 Experimentelles Tiermodell der pulmonalen Hypertonie

Zur Erforschung der pulmonalen Hypertonie und zur Entwicklung neuer Therapiestrategien eignet sich unter den bestehenden Tiermodellen das Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte besonders gut. Es imitiert am deutlichsten den schweren klinischen Verlauf der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie des Menschen.

Anhand der Klassifizierung der World Health Organisation (WHO) für Patienten mit IPAH lassen sich monocrotalininjizierte Ratten nach 4 Wochen Krankheitsverlauf in Klasse II-III einteilen (siehe Klassifizierungstabelle der WHO, Tabelle 2).

Die Tiere zeigen bei geringer Belastung und Aufregung erste Anzeichen von Unwohlsein und Dyspnoe.

Der Krankheitsverlauf schreitet so schnell fort, dass die Tiere spätestens 6 Wochen nach der Monocrotalin-Injektion auch bei Ruhe deutliche Dyspnoe zeigen und ihr Verhalten auf ein stark eingeschränktes Allgemeinbefinden schließen lässt (WHO Klasse IV). Die Sterblichkeit liegt zu diesem Zeitpunkt schon bei 50 %, bei den übrigen Tieren liegen als Anzeichen einer Rechtsherzhypertrophie periphere Ödeme und Zyanose vor. Der rechtsventrikuläre Druck erreicht mit zum Teil über 100 mm Hg systemische Werte, als Folge zeigen sich bei der Sektion vieler Tiere Thoraxergüsse.

Es lassen sich jedoch nicht alle Veränderungen der humanen PH nachempfinden. Die vielfältigen pathognomonischen Gefäßveränderungen der pulmonalen Hypertonie des Menschen treten nicht ganzheitlich bei der Ratte auf.

Klar zu vergleichende Veränderungen sind die Neo-Muskularisierung peripherer Arterien, die Ausbildung einer Mediahypertrophie (Meyrick, Reid, 1979) und die Entwicklung des Cor pulmonale.

Auch kommt es bei beiden zu einer erhöhten Thrombosierung, beim Menschen finden sich zirkulierende Plättchenaggregate (Lopes 1993) und in situ Thrombosen im Bereich von durch die PH entstandenen Läsionen (Wagenvoort 1993). Bei der Ratte kommt es zu intravaskulären Thromben (Lalich 1977, Hayashi 1984).

Bei beiden Erkrankungen sind inflammatorische Veränderungen hauptsächlich mononukleär und im perivaskulären Bereich sichtbar, bei der Ratte zusätzlich im Interstitium (Stenmark 1985, Wilson 1989). Beim Mensch hingegen findet man diese Veränderungen im Bereich der plexiformen Läsionen (Dorfmueller 2003).

Ein deutlicher Unterschied ist, dass diese bei der humanen IPAH in 80 % der Fälle vorkommenden plexiformen Läsionen bis jetzt in keinem Tiermodell nachempfunden werden konnten. Auch eine deutliche Neointimabildung fehlt im Modell der Ratte.

In der humanen PAH kommt es zu einer Dysfunktion der Endothelzellen (Voelkel, Truder 1994), wohingegen der initiale Mechanismus im Modell der Ratte die Endothelschäden und die daraus resultierende Permeabilitätssteigerung ist (Sugita 1983, Wilson 1989, Tanaka 1996).

Da den initiiierenden Mechanismus bei der Ratte ein Toxin bildet, ist der Verlauf natürlich nicht direkt mit dem der humanen PAH zu vergleichen. Es ist jedoch zu bedenken, dass das Monocrotalin bereits 24 Stunden nach der Injektion fast gänzlich aus dem Körper ausgeschieden ist (Hayashi 1967) und dass sich die folgenden pathologischen Veränderungen aufeinander aufbauen.

Das Tiermodell der hypoxisch erzeugten pulmonalen Hypertonie bei der Ratte eignet sich weitaus weniger als das MCT-Modell, da die durch Hypoxie hervorgerufenen Veränderungen weniger gravierend sind und sich nicht so gut mit denen der humanen PAH vergleichen lassen.

Das Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte wurde für die vorliegende Arbeit gewählt, da es eine leicht induzierbare, schwere und gut reproduzierbare pulmonale Hypertonie erzeugt, die mit der pulmonalen Hypertonie des Menschen sowohl pathophysiologisch als auch pathohistologisch gut vergleichbar ist.

4.3 Tergurid und seine Wirkung in experimentellen Studien der Pulmonalen Hypertonie

Tergurid ist in Japan klinisch zugelassen für die Behandlung von Ovulationsstörungen und Hyperprolaktinämie.

Im Gegensatz zu den meisten Ergolinderivaten, wie Ergotamin, Pergolin oder Bromocriptin ist Tergurid ein starker Serotoninrezeptorantagonist, vor allem am 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptor, wie in Studien mit Arterien aus Rattenschwänzen und Schweinelungen gezeigt werden konnte (Kren 2004, Jahnichen 2005). Diese beiden Rezeptoren befinden sich im Endothel und in den glatten Muskelzellen der Pulmonalgefäße und spielen eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der pulmonalen Hypertonie.

Das Interessante ist, dass der 5-HT_{2A}-Rezeptor als Antwort auf einen pathologisch hohen Serotoninspiegel zu einer pulmonalen Vasokonstriktion führt und die Aggregation von Thrombozyten fördert, während der 5-HT_{2B}-Rezeptor die Proliferation glatter Muskelzellen und das Remodeling vermittelt. Durch den Einsatz eines 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B}-Rezeptorhemmers wird die Entwicklung der PAH somit an mehreren Stellen gleichzeitig beeinflusst.

Die durchgeführte Studie zeigt, dass Tergurid vier wichtige Faktoren der PAH beeinflusst:

- Verbesserung der Hämodynamik,
- Verminderung der Rechtsherzhypertrophie,
- Verbesserung des pulmonalen Gasaustauschs und
- neben Vorbeugung neuer Veränderungen in der pulmonalen Gefäßstruktur, macht es auch schon vorhandene Veränderungen rückgängig (anti-remodeling).

Hyperkontraktion und Hyperplasie der glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien sind die Hauptmechanismen der Pathogenese der PAH. Serotoninrezeptoren sind in Immunfärbungen von Lungenschnitten humaner IPAH und experimentell erzeugter PAH in deutlich höherer Anzahl zu finden, als in Färbungen gesunder Kontrollen. In parallelen in vitro Studien zeigte eine pharmakologische Hemmung dieser Rezeptoren durch Tergurid eine Hemmung der Proliferation von primären pulmonalarteriellen smooth muscle cells. Die Zellproliferation führt zu einer „de

Novo“ Muskularisierung der Pulmonalarterien und somit zum Fortschreiten der PAH (Dumitrascu et al. 2008).

Laut Launay et al wird dieses Phänomen vermittelt durch eine verminderte Kollagensynthese und durch eine reduzierte Elastaseaktivität (Launay et al. 2002).

Verschiedene Autoren berichten von einem Anstieg der Serotoninplasmakonzentration unter PAH-Konditionen. So konnte gezeigt werden, dass Serotonin in isolierten Mauslungen eine sofortige Vasokonstriktion bewirkt (Dumitrascu et al. 2008). Der damit zusammenhängende Anstieg des Lungendrucks durch Serotonin wurde durch Tergurid konzentrationsabhängig gesenkt. Morecroft et al berichten, dass Ketanserin, welches ebenfalls ein spezifischer 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonist ist, in der Lage ist, eine durch Hypoxie oder Serotonin erzeugte pulmonale Vasokonstriktion fast vollständig zu beseitigen (Morecroft et al. 2005).

Diese Ergebnisse überdecken sich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Terguridstudie, in der die Wirkung des Serotoninantagonisten sehr deutlich ist.

Nach der Injektion des pflanzlichen Alkaloids Monocrotalin konnte durch die tägliche Behandlung mit Tergurid die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie unterdrückt werden. Tergurid verhindert dosisabhängig den Anstieg des rechtsventrikulären Druckes, bei einer Dosis von zweimal täglich 1,2 mg/kg unterschied sich die MCT-Gruppe mit einem RVSP von $36,4 \pm 1,7$ mm Hg nicht mehr signifikant von den gesunden Kontrolltieren. Die Plazebogruppen zeigten hingegen typische Anzeichen einer pulmonalen Hypertonie, der RVSP war vier Wochen nach der MCT-Injektion auf Werte von $66,1 \pm 5,5$ mm Hg gestiegen und zeigte somit einen deutlich signifikanten Unterschied zu den behandelten Tieren. In der niedrigen Dosis von 2 x täglich 0,4 mg/kg konnte sowohl in der präventiven wie auch in der kurativen Gruppe kein befriedigendes Ergebnis erzielt werden. Beide Werte unterschieden sich nicht signifikant von denen der erkrankten Plazebotiere.

Dahingegen wurde die Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie sogar auch in der niedrigen Dosis von zweimal täglich 0,4 mg/kg Tergurid gänzlich verhindert. Mit einem Quotienten von $0,28 \pm 0,01$ bei 0,4 mg/kg und von $0,26 \pm 0,01$ bei 1,2 mg/kg lag kein signifikanter Unterschied zu den gesunden Tieren ($0,30 \pm 0,01$) vor. Die Rechtsherzhypertrophie bildete sich in den Gruppen mit kranken Kontrolltieren stark aus und wies nach 4 Wochen Krankheitsverlauf einen signifikant höheren Rechts-Linksherz-Quotienten von $0,71 \pm 0,03$ auf. Dieses Ergebnis stellt einen ersten

Hinweis auf die antiproliferative Wirkung von Tergurid durch die Blockade des 5-HT_{2B}-Rezeptors dar.

Die Wandstärke der Pulmonalgefäße verringert sich in allen Therapiegruppen signifikant zu den Werten der Tiere 4 Wochen nach MCT-Injektion in kleinen und mittelgroßen Gefäßen. Auch in den großen Gefäßen über 100 µm konnte eine dosisabhängige Verringerung der Wandstärke verzeichnet werden.

Vergleichbare Ergebnisse brachte die Auswertung des Muskularisierungsgrades der pulmonalen Gefäße. Während die unter dem Einfluss von MCT stark angestiegene Anzahl der voll muskularisierte Gefäße unter der Therapie mit Tergurid in allen Gruppen signifikant sank, stieg der Anteil der nicht muskularisierten Gefäße wieder an. Die antiproliferative Wirkung von Tergurid zeigt sich also deutlich in der Auswertung der Histomorphometrie.

Aus tierärztlicher Sicht lässt sich der klinische Zustand der Tiere nach der Behandlung in Klasse I der WHO-Klassifikation einteilen. Auch die offensichtlichen Auswertungskriterien, wie Überlebensrate und Gewichtsverlauf bestätigten die gute Verfassung der therapierten Tiere. Dosisunabhängig überlebten bis zur vierten Woche 100 % der mit Tergurid präventiv behandelten Ratten, in den mit dem NaAc-Ethanolgemisch behandelten Kontrollgruppen überlebten nur 66,7 % der Tiere. Lediglich in der kurativen Behandlungsgruppe mit der niedrigen Dosis verstarb eine Ratte.

Ähnlich verhielt es sich mit der Gewichtsentwicklung. Die Ratten, die zweimal täglich 1,2 mg/kg Tergurid bekamen, nahmen im Mittel 7,6 % zu, wohingegen bei den Placeboratten eine Abnahme von 3,7 % zu verzeichnen war, obwohl sich die Tiere vom Alter noch in der Wachstumsphase befanden.

Eine Verbesserung des Herzzeitvolumens konnte nur durch einen präventiven Therapieansatz mit einer Dosis von zweimal täglich 1,2 mg/kg erreicht werden.

Der Cardiac Index lag bei den behandelten Tieren bei $36,2 \pm 0,5$ ml/min und unterschied sich somit signifikant von den Placeboratten, welche einen Cardiac Index von $28,0 \pm 2,4$ ml/min aufwiesen und nicht signifikant von den gesunden Kontrolltieren. In der kurativen Gruppe gab es keinen signifikanten Unterschied zu den mit MCT behandelten Ratten.

Bezogen auf die Überlebensrate, das Gewicht und das Herzzeitvolumen hat sich also ergeben, dass nur durch die höhere Dosis von zweimal täglich 1,2 mg/kg überzeugende Ergebnisse erzielt werden konnten. Eine weitere deutliche

Erkenntnis ist, dass in fast alle Versuchsgruppen eine präventive Behandlung zu sehr guten Ergebnissen geführt hat, der kurative Therapieansatz reichte vor allem beim rechtsventrikulären Druck und beim Herzzeitvolumen nicht aus.

Hervorzuheben ist aber noch, dass bei der Langzeitbehandlung mit anderen Ergotderivaten, wie Pergolid und auch Cabergolin, retroperitoneale, pleurale und pericardiale Fibrosen und Herzklappenerkrankungen auftraten (Van et al. 2003). Unter der Therapie mit Tergurid konnten keine solcher Veränderungen festgestellt werden, mehr noch fanden Hauso et al. heraus, dass Tergurid bei Ratten die Entwicklung durch Serotonin verursachter Herzklappenfehler und Herzhypertrophien verhindert (Hauso et al. 2007).

4.4 Klinische Perspektive

Nachdem Ghofrani et al. im Jahr 2007 Studien zum therapeutischen Nutzen von Tergurid an PH-Patienten initiierte, stufte die US-amerikanische Arzneimittelbehörde FDA im Mai 2008 Tergurid als "Orphan"-Arzneimittel zur Behandlung pulmonalarterieller Hypertonie ein.

Mit Tergurid hat sich also ein Medikament gefunden, dass bereits anderweitig klinisch erprobt ist und von den Patienten gut angenommen wird. Es ist zu bedenken, dass Tergurid zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Therapie der PAH hinzugezogen werden sollte, da Serotonin augenscheinlich in der frühen Entwicklungsphase der pulmonalen Hypertonie eine große Rolle zu spielen scheint.

Als optimale Dosis hat sich bei der Ratte eine zweimal tägliche Gabe von 1,2 mg/kg Körpergewicht herauskristallisiert, es sollte also auch beim Menschen auf eine entsprechend hohe Dosis geachtet werden.

Auch die Wirkung von Tergurid als Dopamin D2 Rezeptoragonist ist nicht zu vergessen, denn sicherlich spielen antidepressive Einflüsse bei Patienten mit PAH auch eine gewisse Rolle.

Wegen seiner vasorelaxierenden und stark antiproliferativen Wirkung präsentiert Tergurid somit einen neuen therapeutischen Ansatz in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie.

5 Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertension stellt eine seltene, aber schwere, sehr stark einschränkende und lebensbedrohliche Erkrankung dar. Sie ist charakterisiert durch Vasokonstriktion, Umbauprozesse in den Pulmonalarterien und durch eine daraus folgende Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes.

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) spielt vor allem in der frühen Phase der Krankheitsentwicklung eine große Rolle, aber die pharmakologische Steuerung befindet sich momentan noch im präklinischen Bereich.

Tergurid ist ein 5-HT-Rezeptorantagonist, der bereits anderweitig klinisch erprobt ist und von den Patienten gut angenommen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde in vivo der Einfluss von Tergurid auf das Krankheitsgeschehen der pulmonalarteriellen Hypertonie der Ratte sowohl im präventiven, als auch im kurativen Ansatz untersucht.

Tergurid ist in der Lage, konzentrationsabhängig die Entwicklung und das Fortschreiten der PAH im experimentellen Monocrotalinmodell der Ratte zu verhindern.

Eine Therapie von Woche 0 bis 4 mit einer Terguriddosis von 0,4 und 1,2 mg/kg Körpergewicht zweimal täglich gegeben lindert alle monocrotalininduzierten Veränderungen in der Hämodynamik und der Rechtsherzhypertrophie. Eine ganzheitliche Normalisierung aller Werte, inklusiver der Rechtsherzgröße wird erreicht durch eine in diesem Zeitraum verabreichte zweimal tägliche Dosis von 1,2 mg/kg. Zudem erreicht man durch die gleiche Dosis, eingesetzt zu einem späteren therapeutischen Zeitpunkt von Woche 2 bis 4, eine signifikante Verbesserung der Hämodynamik, der Rechtsherzhypertrophie und des vaskulären Remodeling.

Weiterhin wird die Überexpression von 5-HT-Rezeptoren in den Lungen der Monocrotalin-behandelten Raten gezeigt.

Die Arbeit stellt folglich ein bereits klinisch zugelassenes Medikament vor, das durch seine vasorelaxierende und stark antiproliferative Wirkung einen neuen therapeutischen Ansatz in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie präsentiert.

6 Summary

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a life-threatening disease characterized by vasoconstriction and remodeling of the pulmonary vasculature.

The serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]) pathway has been shown to play a major role in the pathogenesis of PAH, but pharmacological modulation of this pathway for treatment of pulmonary arterial hypertension is to date at preclinical level.

Tergurid is a 5-HT receptor (5-HTR) antagonist which is well tolerable and clinically approved for ovulation disorders.

In this study we assessed *in vivo* the effect of therapeutic 5-HT signaling inhibition on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats as preventive or curative approach.

Tergurid inhibited both proliferation and migration of PA-SMC in a concentration-dependent manner. When chronically applied from week 0 to 4, Tergurid at 0.4 and 1.2 mg/kg two times a day significantly attenuated all monocrotaline-induced hemodynamic and gas exchange abnormalities as well as right heart hypertrophy. Full normalization of all variables including right ventricle size was achieved employing 1.2 mg/kg two times a day during this period. Moreover, when Tergurid at the same dose was used for late therapeutic intervention (from week 2 to 4) right heart hypertrophy, hemodynamic, gas exchange and cardiac and pulmonary vascular remodelling changes were significantly improved.

5-HT inhibition by Tergurid exhibited antiproliferative effects on pulmonary artery smooth muscle cells. Chronic Tergurid treatment prevented the development and progression of MCT-induced PAH in rats. Thus, Tergurid represents a valuable novel therapeutic approach in PAH.

7 Literaturverzeichnis

Abenheim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, et al. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension*. **N Engl J Med** 1996; **335**(9): 609-16.

Ashmore RC, Rodman DM, Sato K, Webb SA, O'Brien RF, McMurtry IF, and Stelzner TJ. *Paradoxical constriction to platelets by arteries from rats with pulmonary hypertension*. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 1991; **260**: H1929–H1934.

Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH et al. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension*. **N Engl J Med** 1996; **334**: 296-302.

Bruner LH, Carpenter LJ, Hamlow P, Roth RA. *Effect of a mixed function oxidase inducer and inhibitor on monocrotaline pyrrole pneumotoxicity*. **Toxicol Appl Pharmacol** 1986; **85**: 416-427.

Christman BW, McPherson CD, Newman JH et al. *An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension*. **N Engl J Med** 1992; **327**(2): 70-5.

Dony E. *Therapeutischer Effekt des Protein-Tyrosinkinasehemmers Imatinib (STI571) im Modell der Monocrotalin-induzierten pulmonalen Hypertonie der Ratte*. **Giessen, Justus-Liebig-Universität, FB 10 Veterinärmedizin** 2006.

Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M. *Inflammation in pulmonaryarterial hypertension*. **Eur Respir J** 2003; **22**(2): 358-63.

Dumitrascu R, Kulcke C, Kouri F, Ghofrani H.A, Reiter R, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F, Eickelberg O, Schermuly R.T. *Teguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats*. **Eur Respir J** 2011; **37**: 1104-1118.

Eddahibi, S, et al. *Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene.* **J Clin Invest** 2000; **105**: 1555–1562.

Erspamer V, Asero B. *Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine.* **Nature** 169 1952; Nr. 4306: S. 800–801.

Farber HW, Loscalzo J. *Pulmonary arterial hypertension.* **N Engl J Med** 2004; **351**(16): 1655-65.

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D et al. *Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension.* **N Engl J Med** 1993; **328**(24): 1732-9.

Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. *Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond.* **Nat Rev Drug Discov** 2006; **5**(8): 689-702.

Hatano S, Strasser T. *Primary Pulmonary Hypertension Report on a WHO Meeting Geneva.* **World Health Organization** 1975; 26.

Hauso O, Gustafsson BI, Loennechen JP, Stunes AK, Nordrum I, Waldum HL. *Longterm serotonin effects in the rat are prevented by terguride.* **Regul Pept** 2007; **143**(1-3): 39-46.

Hayashi Y, Lalich JJ. *Renal and pulmonary alterations induced in rats by a single injection of monocrotaline.* **Proc Soc Exp Biol Med** 1967; **124**(2): 392-396.

Hayashi Y, Kokubo T, Takahashi M, Furukawa F, Otsuka H, Hashimoto K. *Correlative morphological and biochemical studies on monocrotaline-induced pulmonary alterations in rats.* **Toxicol Lett** 1984; **21**(1): 65-71

Himanshu N. Parikh, Li-Xin Liu and Louis A Chiodo. *P_{2U} Receptor Stimulation Increases Intracellular Ca²⁺ in Hybrid N18TG2 X Mesencephalon (MES-23.5) Cells Via Two Distinct Mechanisms.* **Department of Pharmacology, Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock** 1997.

Hoeper, M. *Endothelin-Rezeptor-Antagonismua als neues Therapieprinzip bei kardiovaskulären Erkrankungen*. **UNI-MED Verlag AG Bremen 2003**.

Hoorn CM, Wagner JG, Roth RA. *Effects of monocrotaline pyrrole on cultured rat pulmonary endothelium*. **Toxicol Appl Pharmacol 1993; 120: 281-287**.

Hoyer D, Clarke D, Fozard J, et al. *International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)*. **Pharmacol. Rev. 1994; 46 Nr. 2: 157–203**.

Humbert M, Nunes H, Sitbon O, Parent F, Herve P, Simonneau G. *Risk factors for pulmonary arterial hypertension*. **Clin Chest Med 2001; 22(3): 459-75. 27**.

Jahnichen S, Horowski R, Pertz HH. *Agonism at 5-HT_{2B} receptors is not a class effect of the ergolines*. **Eur J Pharmacol 2005; 513(3): 225-8**.

Jones R, Jacobson M, Steudel W. *alpha-smooth-muscle actin and microvascular precursor smoothmuscle cells in pulmonary hypertension*. **Am J Respir Cell Mol Biol 1999; 20(4): 582-94. 12**.

Kay, JM; Smith, P; Heath, D. *Aminorex and the pulmonary circulation*. **Thorax. 1971; 26(3): 262–270**.

Kashara Y, Kiyatake K, Tatsumi K, Subito K, Kakusaka I, Yamagata S, Ohmori S, Kitada M, Kuriyama T. *Bioactivation of monocrotaline by P-450 3A in rat liver*. **J Cardiovasc Pharmacol 30 1997; 124-129**.

Kren V, Eich E, Pertz HH. *Pergolide, terguride and N,N'-spacer-linked oligomers of both interact with 5-HT_{2A} receptors of rat tail artery*. **Physiol Res 2004; 53: 35-43**.

Lalich JL, Johnson WD, Raczniak TJ, Shumaker RC. *Fibrin thrombosis in monocrotaline pyrrole-induced cor pulmonale in rats*. **Arch Pathol Lab Med 1977; 101(2): 69-73**.

Launay JM, Herve P, Peoc'h K et al. *Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. Nat Med* 2002; 8(10): 1129-35.

Löffler *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 4. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001 S. 459.

Lopes AA, Maeda NY, Almeida A, Jaeger R, Ebaid M, Chamone DF. *Circulating platelet aggregates indicative of in vivo platelet activation in pulmonary hypertension. Angiology* 1993; 44(9): 701-706.

Meyrick B, Reid L. *The effect of continued hypoxia on rat pulmonary arterial circulation. An ultrastructural study. Lab Invest* 1978; 38(2): 188-200. 11.

Meyrick B, Reid L. *Development of pulmonary arterial changes in rats fed Crotalaria spectabilis. Am J Pathol* 1979; 94: 37-50.

Miyata M, Dakuma F, Ito M, Ohira H, Sato Y, Kasukawa R. *Athymic nude rats develop severe pulmonary hypertension following monocrotaline administration. Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121(3): 246-252.

Miyata M, Ito M, Sasajima T, Ohira H, Sato Y, Kasukawa R. *Development of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension Is Attenuated by a Serotonin Receptor Antagonist. Lung* 2000, 178: 63-73.

Morecroft I, Loughlin L, Nilsen M et al. *Functional interactions between 5-hydroxytryptamine receptors and the serotonin transporter in pulmonary arteries. J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313(2): 539-48.

Nagatomo T, Rashid M, Habib Abul Aliuntasir, Komiyama T. *Functions of 5-HT^{2A} receptor and its antagonists in the cardiovascular system. Pharmacology & therapeutics* 2004, 104(1): 59-81.

Nickel, Schummer, Seiferle. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III Kreislaufsystem*. 3. Auflage Blackwell Wissenschaftsverlag Berlin, Wien 1996.

Nobre VM; Dantas AF; Riet-Correa F, Barbosa Filho JM, Tabosa IM, Vasconcelos JS. *Acute Intoxication by Crotalaria retusa in sheep*. **Toxicon** 2005; **45(3)**: 347-52.

Olschewski H, Walmrath D, Schermuly RT, Ghofrani A, Grimminger F, Seeger W. *Aerosolized prostacyclin and iloprost in severe pulmonary hypertension*. **Ann Intern Med** 1996; **124**: 820-824.

Pan LC, Lamé MW, Morin D, Wilson DW, Segall HJ. *Red blood cells augment transport of reactive metabolites of monocrotaline from liver to lung in isolated and tandem liver and lung preparations*. **Toxicol Appl Pharmacol** 1991; **110**: 336-446.

Rapport M, Green A, Page I. *Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization*. **Journal of Biological Chemistry** 1948; **176 Nr. 3**: 1243–1251.

Reindel JF, Ganey PE, Wagner JG, Slocombe RF, Roth RA. *Development of morphologic, hemodynamic, and biological changes in lungs of rats given monocrotaline pyrrole*. **Toxicol Appl Pharmacol** 1990; **106**: 179-200.

Richter D, Manzke T, Wilken B; Ponimaskin E. *Serotonin receptors: guardians of a stable breathing*. **Elsevier Ltd.** 2003; **543**.

Rubens C, Ewert R, Halank M et al. *Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension*. **Chest** 2001; **120(5)**: 1562-9.

Rubin LJ. *Current concepts: primary pulmonary hypertension*. **N Engl J Med** 1997; **336**: 111-17.

Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. *Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition*. **J Clin Invest.** 2005; **115(10)**: 2691-4.

Schmidt, Thews. *Physiologie des Menschen*. **27. Auflage**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1997.

Setola V, Hufeisen SJ, Grande-Allen KJ, Vesely I, Glennon RA, Blough B, Rothman RB, Roth BL. *3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") induces fenfluraminelike proliferative actions on human cardiac valvular interstitial cells in vitro.* **Mol Pharmacol** 2003; **63**: 1223–1229.

Simonneau G, Galie N, Rubin LJ et al. *Clinical classification of pulmonary hypertension.* **J Am Coll Cardiol** 2004; **43**(12 Suppl S): 5S-12S. 35.

Stenmark KR, Morganroth ML, Remigio LK, Voelkel NF, Murphy RC, Henson PM, Mathias MM, Reeves JT. *Alveolar inflammation and arachnidonate metabolism in monocrotaline-induced pulmonary hypertension.* **Am J Physiol** 1985; **248**: H859-H866.

Sugita T, Hyers TM, Dauber IM, Wagner WW, Mc Murtry IF, Reeves JT. *Lung vessel leak precedes right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats.* **J Appl Physiol** 1983; **54**(2): 371-374.

Tanaka Y, Schuster DP, Davis EC, Patterson GA, Botney MD. *The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling.* **J Clin Invest** 1996; **Vol 98 No 2**: 434-442.

Temgoua L *Biosynthese und Aufbau von Serotonin* **Universität Heidelberg** 2007
www.rzuser.uni-heidelberg.de/~ltemgoua/images/350px-Serotonin_Biosynthese_svg.png

Twarog B, Page I. *Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination.* **American Journal of Physiology** 1953; **175** Nr. 1: 157–161.

Van CG, Flamez A, Cosyns B et al. *Treatment of Parkinson's disease with pergolide and relation to restrictive valvular heart disease.* **Lancet** 2004; **363**(9416): 1179-83.

Valdivia E, Lalich JJ, Hayashi Y, Sonnad J. *Alterations in pulmonary alveoli after a single injection of monocrotaline.* **Arch Pathol** 1967; **84**(1): 64-76.

Voelkel NF, Tudor RM, Bridges J, Arend WP. *Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline.* **Am J Respir Cell Mol Biol** 1994; 11(6): 664-675.

Wagenvoort CA, Mulder PG. *Thrombotic lesions in primary plexogenic arteriopathy. Similar pathogenesis or complication?* **Chest** 1993; 103(3): 844-849.

Wharton J, Strange JW, Moller GM et al. *Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells.* **Am J Respir Crit Care Med** 2005; 172(1): 105-13.

Wilson DW, Lamé MW, Dunston SK, Segall HJ. *DNA damage cell checkpoint activities are altered in monocrotaline pyrrole-induced cell cycle arrest in human pulmonary artery endothelial cells.* **Toxicol Appl Pharmacol** 2000; 166: 69-80.

Wilson DW, Segall HJ, Pan CW, Dunston SK. *Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats.* **Microvasc Res** 1989; 38: 57-80.

Wilson DW, Segall, HJ. *Changes in type II cell populations in monocrotaline pneumotoxicity.* **Am J Pathol** 1990; 136(6): 1293-9.

Zamboni L, De Martino C. *Buffered picric acid-formaldehyde: a new, rapid fixative for electron microscopy.* **J Cell Biol** 1967; 35: 148A.

8 Publikationen

Dumitrascu R, Kulcke C, Kouri F, Ghofrani H.A, Reiter R, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F, Eickelberg O, Schermuly R.T. *Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. Eur Respir J* 2011; 37:1104-1118.